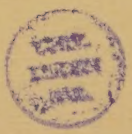
ZELL-MATRIX-WECHSELWIRKUNGEN VON SKELETTMUSKELZELLEN MIT STRUKTURPROTEINEN DER BASALMEMBRAN UND DES ENDOMYSIUMS

UWE KÜHL

Diss München
1984



ZELL-MATRIX-WECHSELWIRKUNGEN VON SKELETTMUSKELZELLEN MIT STRUKTURPROTEINEN DER BASALMEMBRAN UND DES ENDOMYSIUMS

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwigs-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Uwe Kühl aus Hamburg
November 1983

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Kühn
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ellen Fanning-Honegger

Tag der mündlichen Prüfung: 10.2.1984

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Klaus Kühn für die wohlwollende Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Klaus von der Mark bin ich dankbar für die hervorragende Betreuung der Arbeit und viele anregende Diskussionen.

Herrn Dr. Rupert Timpl möchte ich für seine Unterstützung bei der Herstellung von Laminin und Typ IV Kollagen, sowie für die freundliche Überlassung zahlreicher Antikörper danken.

Frau Muecella Oecalan danke ich für ihre Hilfe in der Zellkultur, Frau Cornelia Lehr und Frau Vida Holtzman für ihre Unterstützung bei der Fertigstellung des Manuskriptes.

Allen Mitarbeitern des Arbeitskreises, insbesondere Herrn Dr. Jürgen Mollenhauer, Herrn Dr. James Bee und Frau Marion van Menxel danke ich für Ratschläge und ständige Hilfsbereitschaft.

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung 1

1. Aufbau und Entwicklung des Skelettmuskels 1

1.1 Zellen des Muskelgewebes 1

1.2 Aufbau des Muskelbindegewebes 3

1.3 Entwicklung des Skelettmuskels 6

1.4 Rolle der extrazellulären Matrix in der Entwicklung, Degeneration und Regeneration des Skelettmuskels. 8

Aufgabenstellung 9

Teil I: Aufbau und Synthese der extrazellulären Matrix des Skelettmuskels 11

Einleitung: Struktur der Matrixproteine 11

1. Kollagen 11

2. Laminin 14

3. Fibronektin 16

Ergebnisse 19

1. Verteilung der Matrixproteine im Skelettmuskel im Immunfluoreszenzüberblick 19

Biosynthese der Matrixproteine 21

2. Gewinnung von reinen Myoblasten 22

3. Biosynthese der interstitiellen Matrixproteine 26

3.1 Synthese von Typ V Kollagen 26

3.2 Synthese des Fibronektins 29

4. Intrazelluläre Immunfluoreszenz 30

4.1 Primärzellkulturen 32

4.2 L6-Zellen 33

4.3 Fibroblasten 33

5. Abhängigkeit der Kollagensynthese vom Differenzie-

rungszustand der Myoblasten 34

6. Extrazelluläre Verteilung der interstitiellen Matrixproteine 34

7. Bioynthese der Basalmembranproteine 37

7.1 Primärzellkulturen 37

7.1.1 Synthese von Typ IV Kollagen 37
7.1.2 Synthese von Laminin 39

7.2 Untersuchungen an einer Myoblasten-Zellinie 40

7.3 Synthese der Basalmembranproteine in Fibroblastenkulturen 41

8. Intrazelluläre Immunfluoreszenz 42

8.1 Primärmuskelzellen 42

8.2 L6-Zellen 43

8.3 Fibroblasten 43

9. Extrazelluläre Verteilung von Laminin und Typ IV Kollagen 44

10. Typ V Prokollagen 46

10.1 DEAE-chromatographischer Nachweis des Typ V Prokollagens 48

10.2 Immunpräzipitation des Typ V-Prokollagens 51

10.3 Umwandlung der Precursorformen in Typ V Kollagen 51

Teil II: Zell-Matrix- und Zell-Zell-Wechselwirkungen im Skelettmuskel 55

Einleitung 55

Ergebnisse 59

1. Durchführung der Attachmentassays 59

1.1 Vorbereitung der Microtiterplatten 59

1.2 Auswertung der Bindungstests 59

1.3 Messung der Spontanfreisetzung der in Zellen inkorporierten Radioaktivität 60

1.4 Bindung von Kollagenen an Plastik 62

2. Attachment von L6-Zellen 63

3. Einfluß von Fibronektin und Laminin auf das Attachment von L6-Zellen an Kollagen 67

4. Inhibition des Attachments mit Antikörpern 69

5. Korrektur der Inhibitionswerte mit anti-Laminin Seren 71

6. Attachment von primären Myoblasten 73

7. Vergleich der Attachmentdaten unter verschiedenen Testbedingungen 77

8. Vergleich der Adhäsion von Muskelzellen und Fibroblasten an Kollagen/Laminin und Kollagen/Fibronektin Substraten 79

9. Wechselwirkungen des Laminins mit Kollagenen und Muskelzellen 81

9.1 Bindung von Laminin an Kollagen 82

9.1.1 Radiobindungstests 82
9.1.2 ELISA 83

9.2 Bindung von Laminin an Zellen 85

10. Einfluß von Kollagen, Laminin und Fibronektin auf die Fusion von Myoblasten 86

11. Zell-Zell-Wechselwirkungen 88

Teil III: Isolierung eines Laminin-bindenden Proteins aus Muskelzellmembranen 93

Ergebnisse 95

1. Reinigung der Zellmembranen 95

2. Bindung von Laminin an Membranen 95

3. Identifizierung einer Laminin-bindenden Membrankomponente 98

4. Reinigung des 68K-Proteins 98

5. Aminosäurezusammensetzung des 68K-Proteins 103

6. Bindung des 68K-Proteins an Matrixproteine 105

7. Integration des 68K-Proteins in Liposomen 106

8. Bindungstests mit 68K-Liposomen 108

9. Lokalisierung des 68K-Proteins in Geweben und Zellkulturen 110

9.1 Charakterisierung des 68K-Antiserums 110

Diskussion 115

Zusammenfassung 142

Experimenteller Teil 147

1. Material 147

1.1 Zellkultur 147

1.2 Biochemie 148

1.3 Immunologie 149

1.4 Säulenmaterial 150

1.5 Enzyme 150

1.6 Geräte 150

2. Zellkulturen 151

2.1 Wachtel- und Hühnermuskelzellen 153

2.2 Mausskelettmuskelzellen 154

2.3 L6-Muskelzellen 155

2.4 Muskelzellen aus humanem Gewebe 155

2.5 Mausmuskelfibroblasten 156

2.6 Humanmuskelfibroblasten 156

2.7 Humanhautfibroblasten 156

3. Attachmentassays 157

3.1 Vorbereitung der Platten 157

3.2 Vorbereitung der Zellen 158

3.3 Durchführung des Bindungstests 159

4. Nachweis und Charakterisierung von Proteinen 161

4.1 Radioaktive Markierung von Zellkulturen 161

4.2 Pepsinabbau 162

4.3 Kollagenaseabbau 162

4.4 V8-Proteasespaltung 163

4.5 Bromcyanabbau 163

4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 163

4.7 Fluorographie und Densitometrie 164

4.8 Lokalisierung nichtradioaktiver Gelbanden 165

4.9 Immunpräzipitation 165

5. Isolierung und Reinigung von Proteinen 167

5.1 Typ V Kollagen 167

5.2 Fibronektin 168

5.3 7S (long) aus Plazenta 169

5.4 Laminin aus EHS-Maustumor 170

5.5 Typ IV Kollagen aus EHS-Tumor 171

5.5.1 Säurelösliches Typ IV Kollagen 171
5.5.2 Pepsinextrahiertes Typ IV Kollagen 171

5.6 Typ V Prokollagen 172

6. Kopplung von Proteinen an Sepharose 172

7. Herstellung und Reinigung von Antikörpern 173

7.1 Immunisierung 173

7.2 Serologische Testmethoden 174

7.2.1 Passive Hämagglutination 174
7.2.2 ELISA 175
7.2.3 Charakterisierung der Antikörper durch Immunfluoreszenz 176

8. Herstellung von F_{ab}-Fragmenten 176

9. Immunhistologie 177

10. Fototechnik 178

11. Jodierung von Proteinen und Membranen 179

11.1 Jodierung mit Chloramin T 179

11.2 Jodierung mit Jodogen 179

12. Elektronenmikroskopie 180
12.1 Zellkulturen 180
12.2 Schragbedampfung 180
12.3 Negativfarbung 181
13. Herstellung der Membranen 181
14. Western Blot 182
14.1 Proteinblot 182
14.2 Immunblot 183
15. Sepharosebindungstest 183
16. Liposomenexperimente 183
16.1 Herstellung der Liposomen 184
16.2 Proteineinbau in Liposomen 184
16.3 Liposomenbindungstests 184
Literatur 185

Abkürzungen

BAPN	2-Aminoproprionitril
CLS	Kollagenase
CM	Carboxymethylcellulose
CMFS	Kalzium-Magnesium-freie Saline
cpm	counts per minute
DEAE	Diäthylaminoäthylcellulose
DMEM	Dulbeccos modified Eagles Medium
DOC	Deoxycholat-Natriumsalz
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
EE	Embryoextrakt
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
MSA	Mausserumalbumin
F 12	Ham's F 12 Medium
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HS	Pferdeserum
KNS	Kaninchennormalserum
NEM	N-Äthylmaleinimid
NP 40	Nonidet P 40
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PMSF	Paramethylsulfonylfluorid
PPO	2,5-Diphenyloxaxol
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Trisgepufferte Saline
TEA	Triäthanolamin

EINLEITUNG

Durch Interaktionen von Zellen mit der extrazellulären Matrix treten Veränderungen der genetischen Expression und Zellfunktionen bei einer Vielzahl von Zelltypen auf. Das Verständnis der hierbei ablaufenden Zell-Matrix-Wechselwirkungen setzt die Kenntnis des Matrixaufbaus und der Zelloberflächenstruktur voraus.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Ursprung und der Verteilung verschiedener Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) der Skelettmuskulatur, den Interaktionen von Muskelzellen mit dieser Matrix und den hieraus resultierenden Konsequenzen für die weitere Zellentwicklung.

1. Aufbau und Entwicklung des Skelettmuskels

1.1 Zellen des Muskelgewebes

Die funktionelle Einheit des Skelettmuskels ist eine zylindrische, vielkernige Muskelzelle mit einem Durchmesser von 10 - 100 µm und einer Länge bis zu mehreren Zentimetern. Diese Muskelschläuche entstehen durch Fusion einkerniger Muskelzellen. Ihre Kerne sind zu keiner weiteren DNA-Synthese mehr fähig, so daß weiteres Wachstum des Muskels nur durch Verschmelzen mit weiteren Myoblasten möglich ist.

Charakteristisch für die Muskelfasern ist ihre bereits im Lichtmikroskop sichtbare Querstreifung sowie eine Vielzahl von hintereinander liegenden Zellkernen in der Peripherie der Zelle, direkt unterhalb der Plasmamembran. Die Querstreifung entsteht durch die Anordnung der kontraktilen Elemente aus Aktin- und Myosinfilamenten; ihre Periodizität ist abhängig vom Kontraktionszustand des Muskels. Jede Muskelfaser ist von einer eigenen Basalmembran umhüllt, die als Bestandteil des Sarkolemms (s.u.) der Plasmamembran direkt aufliegt, und die einzelnen Zellen voneinander und vom umgebenden Bindegewebe abgrenzt (Abb. 1).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Muskelschläuche haben gezeigt, daß ein Teil der im Lichtmikroskop sichtbaren Muskelzellkerne außerhalb der Muskelfasern liegt und zu kleinen, flachen Myosatellitenzellen gehört, die zwischen der Muskelzellmembran und der Basalmembran liegen (Mauro 1961; Muir et al., 1965). Diese Zellen werden als undifferenzierte Muskelstammzellen angesehen, die die Quelle für zusätzliche Muskelzellkerne bei hypertrophischem Muskelwachstum bilden (Moss und Leblond, 1971) und die auch für die Regeneration nach Verletzungen der Muskelfaser verantwortlich sind. Ihr Anteil liegt in jungem Gewebe bei über 10 % und nimmt mit zunehmendem Alter des Muskels auf etwa 2,5 % ab.

Nicht alle Zellen, die in unmittelbarer Umgebung der Muskelfasern gefunden werden, sind notwendigerweise Satellitenzellen. Aufgrund morphologischer Kriterien wurden

Macrophagen, Leukocyten und vor allem Fibroblasten im Muskelgewebe lokalisiert. Diese Zellen werden in erster Linie im Endo- und Perimysium (s.u.) angetroffen, nach pathologischen Prozessen aber auch unterhalb der Basalmembran (Franzini-Armstrong, 1979; Mastaglia et al., 1975). Foetaler Muskel, der in dieser Arbeit das bevorzugte Studienobjekt bildete, enthält außerdem eine je nach Entwicklungsstadium unterschiedliche Anzahl proliferativer, einkerniger Myoblasten, die später zu Muskelschläuchen fusionieren.

1.2 Aufbau des Muskelbindegewebes

Das Bindegewebe des Skelettmuskels ist vor allem für die Kraftübertragung zwischen kontraktilen Fasern und Sehnen verantwortlich. Daneben besitzen verschiedene makromolekulare Komponenten des Bindegewebes einen Einfluß auf die Zellfunktion und den zellulären Phänotyp des Skelettmuskels. Für die morphologische Beschreibung unterscheidet man drei Arten von Bindegewebsschichten, das Endo-, Peri- und Epimysium.

Die quergestreifte Muskelfaser ist durch das Sarkolemm bestehend aus Plasmamembran, Basalmembran und den retikulären bzw. kollagenen Microfibrillen des Endomysiums umgeben (Abb. 1) (Hanak und Böck, 1971).

Die Basalmembran des Muskels, die nur ca. 20-50 nm dick ist, enthält, wie andere Basalmembranen auch, spezielle Basalmembranproteine wie Laminin, Typ IV Kollagen und

Proteoglykane (s.a. Diskussion) (Wick et al., 1979; Sanes and Hall, 1979) (Abb. 2).

Basalmembranen im allgemeinen bilden eine Trennschicht zwischen Bindegewebe einerseits und dem Epithel, dem Endothel und Mesenchym, oder Muskelfibrillen und dem Nervengewebe. Elektronenoptisch erkennt man 3 Schichten. Eine 10 bis 50 nm dicke Lamina rara (Lamina lucida) bildet die Auflage der Zellschicht, die auch für die Synthese dieser Membran verantwortlich ist. Die mittlere Basallamina (Lamina densa) besteht aus einer 20 bis 300 nm dicken Lage aus amorpher Grundsubstanz und wird vom Bindegewebe durch das fibrilläre Faserwerk der retikulären Membran begrenzt.

Über die Zusammensetzung der unterschiedlichen Membranschichten besteht jedoch keine Klarheit. Typ IV Kollagen wurde mittels verschiedener Methoden (Immunfluoreszenz, Elektronenmikroskopie) in der Basallamina lokalisiert. Einige Autoren fanden auch Laminin in dieser Membranschicht, andere dagegen in der Lamina lucida. Durch indirekten Nachweis mit Hilfe von kationischen Markern und Farbstoffen wurde Heparansulfatproteoglycan (HS-PG) sowohl in der Basallamina als auch in den angrenzenden Membranen gefunden (Hay, 1981; Laurie et al. 1982) Das Fibronektin, das nicht in allen Basalmembranen vorhanden ist, befindet sich, zumindest im Muskel, im an die Basalmembran angrenzenden Endomysium (Sanes und Cheney, 1982).

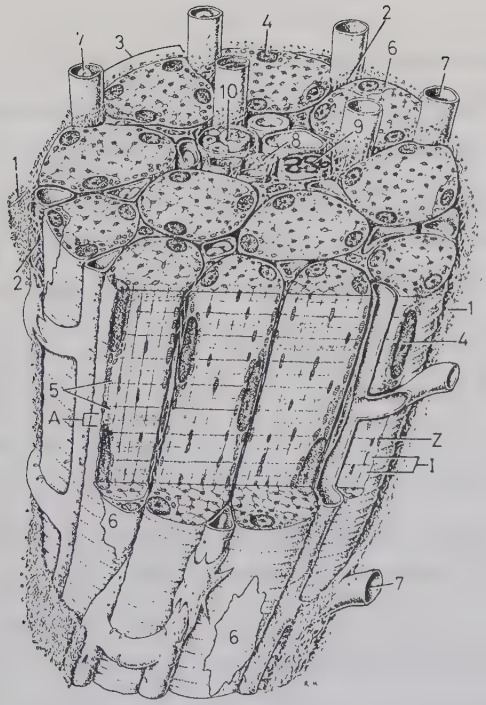


Abb. 1: Schematische Darstellung eines kleinen Muskelfascikels. Perimysium (1), Endomysium (2), einzelner Myotub (3), Zellkern (4), kontraktile Muskelfibrille (5), Satellitenzelle (6), Gefäße (7). (Aus Krstic, 1978).

Eine weitere Bindegewebsschicht des Muskels, das Perimysium, faßt mehrere Muskelfasern zu funktionellen anatomischen Einheiten zusammen und überträgt die bei der Kontraktion auftretenden Kräfte. Viele derartige Sekundärbündel bilden einen Muskel, der durch die dritte Bindegewebsschicht, das Epimysium, mit der Fascie verbunden ist (Abb. 1).

Die äußeren Bindegewebsstrukturen bestehen vor allem aus Kollagenen und Fibronektin (Abb. 3, S.20). Die Zellen sind in diese von ihnen selbst produzierte extrazelluläre Matrix (ECM) eingebettet, die aus einer amorphen Grundsubstanz von Proteoglykanen besteht, in die Eiweißfibrillen (z.B. Kollagen, Glykoproteine) eingelagert sind (Abb. 3).

Die genaue Zusammensetzung der verschiedenen Bindegewebsstrukturen an Kollagentypen, Fibronektin und Laminin war noch nicht vollständig beschrieben. Der erste Teil dieser Arbeit befaßt sich daher mit der chemischen und histochemischen Analyse der Bindegewebe des Skelettmuskels und dem zellulären Ursprung der Makromoleküle der ECM.

1.3 Entwicklung des Skelettmuskels

Die Zellen der Skelettmuskulatur sind ein Teil der mesenchymalen Derivate. Sie entwickeln sich aus dem Mesoderm, sind also ontogenetisch mit den Bindegewebszellen, Knochen- und Knorpelzellen, sowie Nerven- und Blutzellen verwandt. Fibroblasten (Fibrocyten) und Myoblasten (Myocyten) stammen dabei offensichtlich aus einem gemeinsamen Vorläuferkompar-

timent (Holtzer et al., 1972). Die Skelettmuskelzellen der Extremitäten stammen aus den sogenannten Myotomzellen der Somiten, die in den Teil des lateralen Mesoderms einwandern, der die Extremitätenknospe bildet (Christ und Jacob, 1978).

Die entstandenen Myotomzellen werden in einem frühen Stadium der Entwicklung spindelförmig und bilden die sich lebhaft teilenden Muskelvorläuferzellen. Einige davon differenzieren sich zu den echten Myoblasten, die sich aneinanderlagern und mit ihren Zellmembranen zu vielkernigen Muskelschläuchen verschmelzen. Andere Vorläuferzellen bleiben undifferenziert und lagern sich den neugebildeten Myotuben an. Diese sogenannten Satellitenzellen bilden das Regenerationspotential der Muskulatur im Falle von Verletzungen und anderer degenerativer Prozesse. Beide Zelltypen werden dann während ihrer weiteren Entwicklung von einer gemeinsamen Basalmembran eingeschlossen.

Die Vermehrung und das Wachstum der Myotuben verläuft in engem Kontakt mit den bereits vorhandenen Muskelschläuchen. Postmitotische, d.h. fusionsfähige Myoblasten, lagern sich an die Basallamina der älteren Myotuben an, wandern teilweise an ihnen entlang und fusionieren bevorzugt am Ende der Muskelschläuche (Fear, 1977). Neue Myotuben werden ausgebildet, indem die einkernigen Myoblasten auf der Basalmembran älterer Zellen miteinander fusionieren. Dabei sind die neugebildeten Myotuben den älteren nicht einfach angelagert, sondern es liegen Auffaltungen der einander anliegenden Membranen vor, durch die ein enger Kontakt über

eine vergrößerte Oberfläche ermöglicht wird (Landon, 1970; 1971). Eine ähnliche Vergrößerung der Kontaktfläche wird auch bei der Fusion einkerniger Myoblasten miteinander angetroffen (Konigsberg, pers. Mitt.).
Der Vorgang der Fusion von einkernigen Zellen kann *in vitro* mit embryonalen Myoblasten aus Hühner-, Wachtel- oder Mausskelettmuskulatur nachvollzogen werden. Fast alle Kenntnisse über den Mechanismus der Fusion sind in solchen Zellkulturen erhalten worden (Review s. Pearson, 1980).

1.4 Rolle der extrazellulären Matrix in der Entwicklung, Degeneration und Regeneration des Skelettmuskels.

Die ECM ist nicht nur für die mechanische Stabilität und die Kraftübertragung im Skelettmuskel verantwortlich, sie spielt auch eine zentrale Rolle in der Entwicklung, Regeneration und Degeneration der Muskulatur. Hauschka und Konigsberg (1966) haben gezeigt, daß Kollagen für die Fusion von Myoblasten in vitro notwendig ist. Die Regeneration von Muskelschläuchen nach Läsionen erfolgt durch Einsprossung in verbliebene Skelette der Basalmembran des zerstörten Muskels (Vracko und Benditt, 1972). Schließlich kann die Wucherung des Bindegewebes im Muskel bei dystrophischen Veränderungen eine Ursache für die Degeneration von Muskelzellen sein. Im zweiten Teil dieser Arbeit soll daher die Wechselwirkung von Myoblasten mit verschiedenen makromolekularen Komponenten der extrazellulären Matrix untersucht werden. Im 3. Teil interessierte uns besonders der Mechanismus der Wechselwirkungen zwischen Myoblasten und Laminin.

Aufgabenstellung

Die extrazelluläre Matrix beeinflußt das Wachstum von Zellen und Geweben. Um zu verstehen, auf welche Weise dies geschieht, benötigt man zunächst einmal eine genauere Kenntnis von der Zusammensetzung und dem Aufbau der zellulären Matrix.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten deshalb die extrazellulären Macromoleküle des Skelettmuskels identifiziert, sowie die Synthese der verschiedenen Komponenten durch die Zellen des Muskels analysiert werden. Für Untersuchungen über die Verteilung der Kollagene Typ IV und V sowie von Laminin und Fibronektin *in vivo* und *in vitro* eignet sich in erster Linie die Immunfluoreszenz. Soweit notwendig, waren die hierfür benötigten spezifischen Antikörper herzustellen und zu reinigen. Die Biosynthese der Matrixproteine, insbesondere Laminin und Typ IV Kollagen durch die verschiedenen Zellen des Muskelgewebes (Myoblasten, Myotuben und Fibroblasten) sollte mit biochemischen und immunologischen Methoden untersucht werden. Insbesondere interessierte die Frage nach dem zellulären Ursprung der Basalmembrankomponenten und ihr Einbau in die Basallaminina der Myotuben in Zellkultur.

Die Rolle von Kollagenen, Laminin und Fibronektin in der Muskeldifferenzierung sollte im zweiten Teil der Arbeit aufgeklärt werden. Durch Untersuchungen der Affinität von Myoblasten an verschiedene Kollagentypen sowie an Laminin

und Fibronektin erhofften wir uns einen Einblick in die Rolle dieser Macromoleküle bei der Adhäsion der Myoblasten und der Fusion zu Myotuben.

Im dritten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob Muskelzellen spezielle Rezeptoren für Matrixproteine besitzen, über die die Zell-Matrix-Wechselwirkungen verlaufen. Diese waren, sofern vorhanden, näher zu charakterisieren und wenn möglich zu isolieren.

Teil I: Aufbau und Synthese der extrazellulären Matrix im Skelettmuskel

EINLEITUNG: Struktur der Matrixßproteine

Kollagene bilden den Hauptbestandteil der Matrixproteine des Skelettmuskels; die verschiedenen genetischen Typen sind aber in unterschiedlichen Mengen auf die einzelnen Bindegewebsschichten verteilt (Abb. 3). Neben diesen typischen Strukturproteinen findet man zusätzlich eine Reihe weiterer Glykoproteine wie Laminin und Fibronektin, sowie Proteoglykane (Duance et al., 1977; Rohde et al., 1979; Sanes und Cheney, 1982).

1. Kollagen

Von den Kollagenen wurden bisher mindestens 10 verschiedene Varianten näher charakterisiert (Reviews s. Miller, 1976; Bornstein und Sage, 1980). Die interstitiellen Kollagene I, II, III und V bestehen aus 3 α-Ketten mit ca. 1050 Aminosäuren, die zu einer rechtsgängigen Superhelix umeinander verdrillt sind. Sie besitzen bei einer Länge von 2900 nm und einem Durchmesser von nur 14 nm ein Molekulargewicht von etwa 300 000 und bilden die Grundbausteine der im Gewebe vorliegenden Kollagenfibrillen (Kühn, 1982).

Kollagentyp	Hauptsächliches Vorkommen
I	Haut, Knochen, Gefäße, Mesenchym, Dentin
II	Elastischer und hyaliner Knorpel
III	Haut, Gefäße, retikuläres Gewebe, Mesenchym
IV	Basalmembranen
V	Plazenta, Muskel, Knochen, Haut

Tab. 1: Genetische Varianten des Kollagens

Im Verlaufe der Entwicklung entstehen die einzelnen Kollagentypen zeitlich geordnet in einem gewebsspezifischen Muster. Die interstitiellen Kollagene I, III und V kommen, wenn auch in unterschiedlichen Mengen, in fast allen Geweben in fibrillärer Form vor (s. Tab. 1). Gewebsspezifisch sind dagegen das im Knorpel vorliegende Typ II sowie das ausschließlich in Basalmenbranen lokalisierte Typ IV Kollagen. Letzteres bildet keine Fibrillen, sondern liegt in einer raumnetzartigen Struktur vor (Kühn et al., 1981)(Abb. 2,a).

Synthetisiert werden die Kollagene in Form ihrer löslichen Vorläufer, den Prokollagenen (Fessler und Fessler, 1978). Die zusätzlichen nichthelikalen amino- und caboxyterminalen Peptide werden nach der Sekretion des Prokollagens in den extrazellulären Raum von Peptidasen abgespalten. Erst hierdurch wird die Zusammenlagerung zu den typspezifischen Fibrillen ermöglicht.

Beim Typ IV Kollagen findet eine derartige Umwandlung des Prokollagens in Kollagen nicht statt (Minor et al., 1976; Heathcote et al., 1978; Alitalo, 1980; Crouch et al., 1980). Das von Zellkulturen und Geweben synthetisierte Typ IV Kollagen besteht aus einem 390 nm langen, durch nichthelikale Bereiche unterbrochenen Molekül aus drei α-Ketten, das an einem Ende eine globuläre Domäne (NC1) mit einem Molekulargewicht von 75-90 K besitzt (Schuppan et al., 1980; Oberbäumer et al., 1982). Die Zusammensetzung der extrazellulären Typ IV Matrix erfolgt einerseits über diesen NC1 Bereich, durch den 2 Kollagenmoleküle miteinander verknüpft werden (Abb. 2a). Am anderen Ende lagern sich je 4 Moleküle zu der sogenannten 7S Einheit zusammen (Timpl et al., 1981), die durch zahlreiche schwer reduzierbare Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Zusätzliche Stabilität erhält die 7S-Domäne durch kovalente Quervernetzungen über Lysinreste, deren Existenz auch in schwerlöslichem Typ IV Kollagen nachgewiesen wurde (Tanzer und Kefalides , 1973). Der Überlappungsbereich im 7S beträgt 30 nm; im Abstand von 28 nm unterbricht ein zusätzlicher pepsinempfindlicher nichthelikaler Bereich (NC2; MG 12-14 K) die Kollagenkette und verleiht der Gesamtstruktur eine erhöhte Flexibilität (Timpl et al., 1981). Der Abstand zwischen zwei 7S-Einheiten beträgt ca. 800 nm (Abb. 2a).

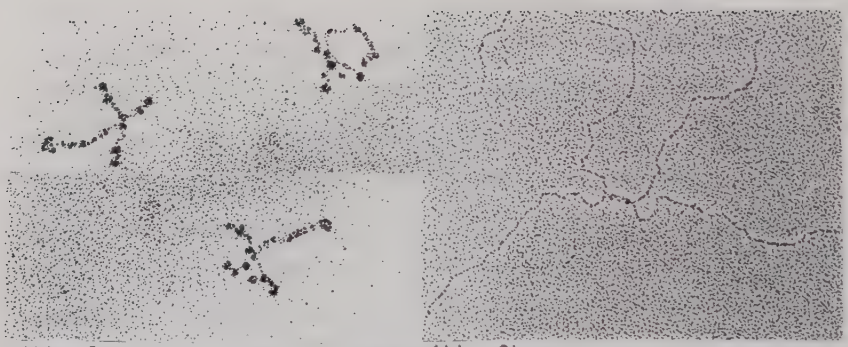


Abb. 2a Abb. 2b

Abb.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Laminin (a) und Typ IV Kollagen (b) nach Rotationsbedampfung mit Platin.
Vergr. (a) x200 000, (b) x130 000 (aus Kühn et al.,1981).

2. Laminin

Neben dem Typ IV Kollagen ist Laminin ein weiterer Grundbaustein der Basalmembranen. Es ist ein Glykoprotein mit hohem Molekulargewicht (MG ca. 950 000) und wurde als natives Protein ursprünglich aus einem Basalmembrantumor (EHS Maustumor) isoliert (Timpl et al., 1979). Das Protein besitzt etwa 13 % Kohlenhydratanteil, deren komplexe N-verknüpfte Zuckerreste einen hohen Anteil an Sialinsäure besitzen.

Im Elektronenmikroskop erscheint das Laminin nach Schrägbedampfung als ein asymetrisches Kreuz mit kettenförmigen und globulären Domänen (Abb. 2,b). Es besitzt keine kollagenen Segmente, dagegen etwa 30 % α-Helix, 15 % β-Helix und 55 % aperiodische Strukturelemente. Der lange Arm (77 nm) des Moleküls endet einerseits in einer globulären Domäne und ist am anderen Ende mit 3 identischen kurzen Armen (36 nm) über Disulfidbrücken verbunden, deren Ketten durch je 2 globuläre Einheiten unterbrochen sind.

Nach Reduktion des Lamininmoleküls erhält man auf dem SDS-Gel 2 Polypeptidketten mit Molekulargewichten von 400 000 bzw. 200 000 (Timpl et al., 1979; Chung et al., 1979; Cooper et al., 1981) im Verhältnis 1 : 3 (Engel et al., 1981). Durch Abbau des Moleküls mit sauren oder neutralen Proteasen (Ott et al., 1981; Rohde et al., 1979; Timpl et al., 1983) erhält man mindestens 7 Fragmente, die durch elektronenmikroskopische und immunologische Methoden bestimmten Strukturen im Gesamtmolekül zugeordnet werden konnten. Aus diesen Arbeiten ergaben sich auch erste Anhaltspunkte über die Anordnung bestimmter funktioneller Bereiche des Laminins, wie der Heparin- und Zellbindungsstellen. Über die Kollagenbindungsstelle ist dagegen bisher noch nichts bekannt.

Neuere Untersuchungen zeigen, daß Laminin ein Adhäsionsprotein darstellt, mit dessen Hilfe sich bestimmte Epithelzellen, die Fibronektin nicht zum Absetzen an die Matrix benutzen können, an Typ IV Kollagen anheften (Terranova et

al., 1980; Vlodavsky et al., 1980). Auch seine Lokalisation in der Lamina rara vieler Basalmembranen könnte mit dieser Funktion als Attachmentprotein in Zusammenhang stehen.

3. Fibronektin

Fibronektin ist ein weiterer Bestandteil der ECM (Chen et al., 1978) (Abb. 3). Es ist ein hochmolekulares Glykoprotein, das in einer unlöslichen Form auf Zelloberflächen und im Bindegewebe, sowie in löslicher Form im Blut und den verschiedenen Körperflüssigkeiten vorkommt. Das dimere Molekül besteht aus zwei fast identischen Polypeptidketten mit einem Molekulargewicht von je 220 000. Beide Ketten besitzen die gleiche NH_2-terminale Sequenz und sind über Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Der Glykosylierungsgrad schwankt je nach Herkunft zwischen 1 und 10 % und ist für die unterschiedlichen Laufstrecken der einzelnen Fibronektine in der SDS-Gelelektrophorese verantwortlich (Übers. s. Yamada und Olden , 1978).

Immunologisch sind die verschiedenen Fibronektine ununterscheidbar, obwohl mit monoklonalen Antikörpern unterschiedliche antigene Determinanten auf Plasma- und Zelloberflächenfibronektin erkannt werden (Atherton and Hynes, 1981; Yamada und Kennedy, 1979). Es besteht eine hohe Kreuzreaktivität zwischen den polyklonalen Antiseren gegen Fibronektin verschiedener Spezies (Kuusela et al., 1976), was auf die große Stabilität des Proteins im Verlaufe der Evolution hinweist.

Fibronektin reagiert mit einer Vielzahl von Makromolekülen (Lindahl und Höök, 1978). Es bindet unter anderem Kollagen, Fibrinogen, Actin, Heparin, Heparansulfat, Dextransulfat, Hyaluronsäure, DNA, Staphylococci und Zelloberflächen (Grinell und Hays, 1978; Yamada, 1981; Kleinman et al., 1979a). Es ist beteiligt am Zellattachment (Klebe, 1974; Pearlstein et al., 1982), bei der Bildung von Thromben des Blutgerinnungssystems, der Phagocytose von Zellmaterial, dem Aufbau der extrazellulären Matrix des Bindegewebes (Furcht et al., 1978; Hedman et al., 1978; Yamada et al., 1980) und der Basalmembranen (Linder et al., 1975; Quaroni et al., 1978; Stenman und Vaheri, 1978) Auch die Organ- und Zelldifferenzierung (Wartiovaara et al., 1980) wird durch dieses Protein beeinflußt.

Mit Ausnahme der transformierten Zellen (Yamada und Olden, 1978; Hynes, 1976; Chen et al., 1977) sind praktisch alle Zellen zur Synthese von Fibronektin befähigt. In Zellkulturen wird es in das Medium von substratgebundenen Zellen abgegeben (Hynes et al., 1982) sowie in die extrazelluläre, fibrilläre Matrix eingebaut (Ali und Hynes, 1977; Hayman und Ruoslathi, 1979).

Auch am Aufbau der extrazellulären Matrix in Muskelzellkulturen ist Fibronektin beteiligt (Abb. 3). In der Wachstumsphase der einkernigen Zellen bildet sich mit zunehmender Zellzahl eine dichter werdende Fibronektinmatrix aus (Chen et al., 1978; Furcht et al., 1978) die mit Beginn der Fusion im Bereich der sich bildenden Myotuben wieder

abgebaut wird und in hochfusionierten Kulturen völlig verschwunden ist. Stattdessen findet man auf einem Teil der mehrkernigen Muskelzellen einzelne Anhäufungen von dichtkondensiertem Fibronektin (Chen, 1977).

ERGEBNISSE

1. Verteilung der Matrixproteine im Skelettmuskel im Immunfluoreszenzüberblick

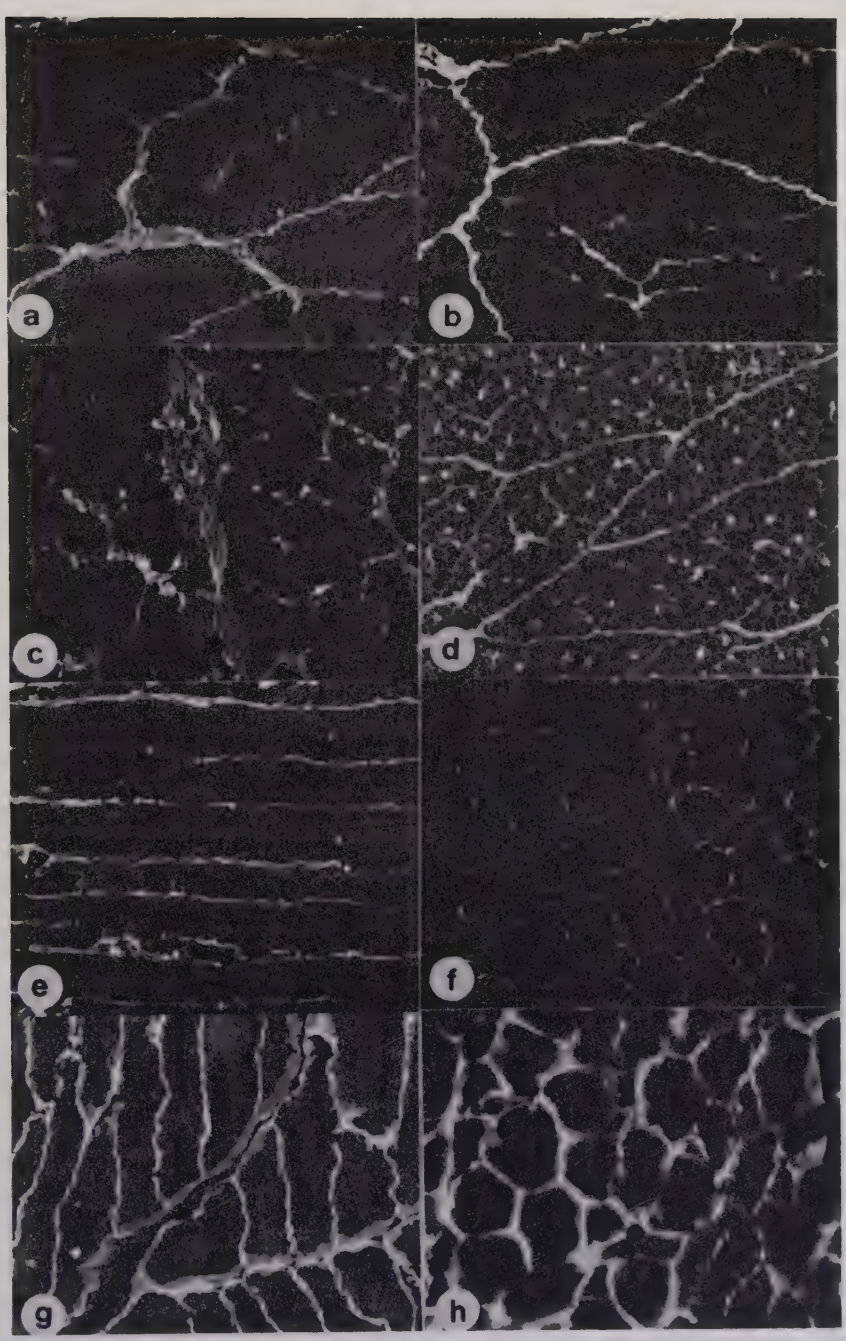
In einer Reihe von Untersuchungen sind Kollagene, Fibronektin, Laminin und Proteoglykane mit Hilfe von Immunfluoreszenzstudien im Muskelgewebe nachgewiesen worden. Die bisher vorliegenden Daten stammen jedoch aus unterschiedlichen Spezies, so daß eine vollständige Analyse in einem System bislang nicht existiert.

Immunhistologische Untersuchungen von Hühner-, Wachtel- und Mausskelettmuskulatur sollte uns deshalb zunächst einen vollständigen Überblick über die Verteilung der Matrixkomponenten auf die einzelnen Bindegewebsschichten verschaffen. Es wurden Gefrierschnitte der Muskulatur in Längs- und Querrichtung angefertigt, und die Proteine mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenztechnik qualitativ nachgewiesen. Die verwendeten Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen, Meerschweinchen oder Ziegen mit gereinigten Proteinen erhalten und durch ELISA oder RIA auf ihre Spezifität überprüft (Isolierung und Reinigung der Proteine und Antikörper s. Material und Methoden).

Die großen Bindegewebssepten des Epi- und Perimysiums enthalten Typ I Kollagen in großen Mengen, sowie neben

Fibronektin einen geringeren Anteil an Typ III- bzw. V Kollagen. Dies ist in Abb. 3 (a-d) am Beispiel der Hühnermuskullatur gezeigt. Auch das der Basalmembran direkt aufliegende Endomysium wird durch alle vier Proteine aufgebaut. Die Immunfluoreszenz zeigt hier vor allem Typ V Kollagen und Fibronektin neben etwas Typ I. Die Basalmembran enthält keine dieser interstitiellen Matrixkomponenten. Statt dessen findet man Proteoglykane (Sanes und Hall, 1979) sowie die membranspezifischen Glykoproteine Typ IV Kollagen und Laminin. In Längs- und Querschnitten der Skelettmuskulatur von Maus (Abb. 3, e-h), Wachtel oder Huhn wird mit Antikörpern gegen beide Proteine nur die Basalmembran selbst angefärbt, während die großen Bindegewebssepten wie z.B. das Epi- oder Perimysium frei bleiben (Abb. 3g).

Abb.3: Verteilung der Matrixproteine im Skelettmuskel: Es wurden Gefrierschnitte von Huhn- (a-d) und Mausskelettmuskulatur (e-h) in Längs- und Querrichtung des Muskels hergestellt und mit Antikörpern gegen verschiedene Proteine angefärbt. (a) angefärbt mit anti Typ I-, (b) anti Typ III-, (c) anti Typ V Kollagen, (d) anti Fibronektin. Die unteren vier Bilder zeigen die Basalmembran im Längs- (e,g) und Querschnitt (f,h) in einer Färbung für Typ IV Kollagen (e,f) bzw. Laminin (g,h). Vergr. (a,d) x240, (b) x380, (c) x960, (e,f) x240, (g,h) x380.


a
b
c
d
e
f
g
h

Biosynthese der Matrixproteine

Die Biosynthese der Matrixproteine des Skelettmuskels wurde im allgemeinen den fibroblastenartigen Zellen zugeschrieben, die in großen Mengen im Endo-, Peri- und Epimysium des Muskelgewebes vorkommen. Der Nachweis, daß auch Muskelzellen an der Kollagensynthese beteiligt sind, bereitete zunächst große Schwierigkeiten. Am Gesamtmuskel waren Untersuchungen wegen der Komplexizität des Gewebes nicht möglich und so war man auf Zellkulturen angewiesen, die man durch mechanische oder enzymatische Dissoziation aus embryonalem Muskelgewebe erhielt.

In verschiedenen Untersuchungen hatten Lipton (1977b), Mayne und Strahs (1974), Abbott et al. (1974) sowie Ketley et al., (1976), die Synthese von Typ I Kollagen in Muskelzellkulturen gezeigt. Wenig später konnte Bailey et al., (1979) dann auch Typ III und V Kollagen nachweisen. Dennoch blieb die eigentliche Herkunft der gefundenen Proteine unklar. Massenkulturen, wie sie in diesen Untersuchungen verwendeten worden waren, enthielten zu einem unterschiedlich hohen Prozentsatz andere Zelltypen, insbesondere Fibroblasten, die sich nur schwer von den Muskelzellen abtrennen ließen. Um eine eindeutige Aussage über die Herkunft der einzelnen Matrixbestandteile machen zu können, war es deshalb zunächst notwendig, Myoblasten in reiner Form zu erhalten, um sie, getrennt von anderen Zellen, zu untersuchen.

2. Gewinnung von reinen Myoblasten

In der Literatur sind verschiedene Trennungsmethoden für Fibroblasten und Myoblasten beschrieben, wie z.B. die Behandlung der Zellen mit Cytochalasin B (Sanger et al., 1974; Turner, 1978) und Cytosinarabinosid (Yeoh und Holtzer, 1977). Auch die bevorzugte Adhäsion von Fibroblasten auf Plastik (Yaffe, 1968) und Verwendung von glutaminfreiem Medium (H.P. Rodemann, pers. Mitt.) wurden zur Anreicherung von Myoblasten ausgenutzt. Keine der aufgeführten Methoden führt jedoch zu 100% reinen, fibroblastenfreien Muskelzellkulturen.

Eine Möglichkeit, relativ saubere Muskelmyoblasten zu erhalten, bietet das Arbeiten mit Wachtelzellen (Caplan, 1976). Dissoziert man Flugmuskulatur von 9 - 11 Tage alten Wachtelembryonen und sät die Zellen in geringen Dichten aus, wird durch Zugabe von Pferdeserum zum Medium das Wachstum der Muskelfibroblasten weitgehend unterdrückt (Konigsberg, 1971; Lipton, 1977a,b). J. Sasse charakterisierte dieses Zellsystem näher und wies nach, daß es möglich ist unter bestimmten Bedingungen reine Myoblasten zu züchten und zu analysieren (Sasse, 1981). Schwieriger ist dies bei anderen Spezies wie Hühner-, Ratten-, Maus- oder menschlichem Muskelgewebe. Bei diesen Zellen werden eine Reihe zusätzlicher Anreicherungsschritte sowie das Anlegen von Klonkulturen notwendig.

Bei der Reinigung von Mausmuskelzellen haben wir zunächst die Tatsache ausgenutzt, daß sich die Myoblasten, anders als die Fibroblasten, nicht auf Plastikschalen absetzen (Yaffe, 1968). Wurde die aus der Muskulatur erhaltenen Zellsuspensionen auf für 1 - 2 Std. unbeschichtete Schalen ausgesät, setzten sich 70 - 80 % der kontaminierenden Fibroblasten ab (Abb. 4,d). Die Muskelzellen wurden im Überstand angereichert und konnten auf Schalen die mit geeigneten Substraten, meist Kollagen, beschichtet waren, transferiert werden (Abb. 4,a).

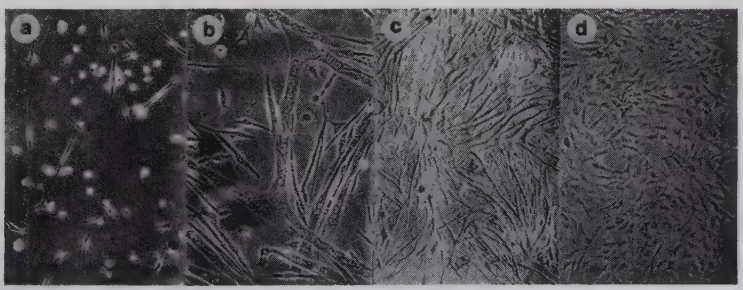


Abb.4: Morphologie von Mausmuskelzellen in Primärkultur. (a-c) Myoblasten nach Abtrennen der Fibroblasten; 3 Tage (a), 6 Tage (b) und 12 Tage (c) in Kultur. (d) Muskelfibroblasten 3 Tage in Kultur. Vergr. (a,b,d) x240; (c) x120.

Während der nächsten Tage vermehrten sich die Muskelzellen rasch und ließen sich in der Folgezeit durch Dispase, einer neutralen Protease, selektiv von den Schalen entfernen. Die Fibroblasten, die einen stärkeren Kontakt mit dem Substrat besaßen, blieben während dieser Behandlung an der Matrix haften. Wenn notwendig, wurde dieser Vorgang noch ein zweites oder drittes Mal wiederholt. Die so erhaltenen Massenkulturen waren praktisch frei von Fibroblasten. Der Anteil der kontaminierenden Zelltypen lag unter 1 %, was aus Klonierungsversuchen, wie sie schon J.Sasse im Wachtelsystem durchgeführt hatte, hervorging. Für diese Klonierungsexperimente wurden etwa 10^3–10^4 Zellen pro 10 cm Schale ausgesät, so daß sie sich in einem relativ großen Abstand voneinander auf dem Substrat absetzten. Während der Wachstumsphase bilden sich einzelne, gut voneinander abgrenzbare Zellklone aus. Alle Klone, die nach mehrtägigem Wachstum fusionierte Myotuben enthielten, sind, da sie einer einzelnen Zelle entstammen, echte Myoblastenklone.

Wegen der geringen Proteinbiosyntheseleistung der Muskelzellen waren die biochemischen Untersuchungen mit derartigen echten Klonkulturen aber kaum möglich; sie wurden vor allem für Immunfluoreszenzuntersuchungen verwendet. Biochemische Untersuchungen wurden mit sogenannten Massenklonkulturen durchgeführt, d.h. mit Kulturen, die eine große Zahl myogener Kolonien enthielten, eventuell aber auch noch durch eine geringe Zahl von Fibroblasten verunreinigt sein konnten. In diesem Fall wurden die Zellen dichter als für die echten Klonkulturen ausgesät, so daß die einzelnen Klone

nicht mehr völlig getrennt von einander vorlagen, sondern aufeinander zuwuchsen und sich an ihren Randbereichen teilweise überlappten. Auch in diesen Kulturen waren die Umrisse der einzelnen Klone aber klar erkennbar, und die Unterscheidung der Zelltypen aufgrund der morphologischen Kriterien gewährleistet.

Aus Untersuchungen von Holtzer et al. (1978) ist nun aber bekannt, daß auch in reinen Myoblastenklonen fibroblastenartige Zellen vorhanden sind. Bei diesen Zellen handelt es sich nach Holtzer um Fibroblasten, die aus gemeinsamen Myoblasten-Fibroblasten Vorläuferzellen stammen, oder nach anderen Autoren um "modulierte" Myoblasten (White et al., 1975; Lipton, 1977b). Morphologische Kriterien, nach denen diese Zellen klassifiziert werden könnten, sind aber umstritten. Trifft Holtzers Annahme zu, so ist es selbst in Klonkulturen prinzipiell unmöglich, fibroblastenfreie Muskelzellen zu erhalten. Der Prozentsatz dieser durch Dedifferenzierung entstandenen Nichtmuskelzellen ist aber gegenüber präparationsbedingten Kontaminationen mit echten Fibroblasten gering. Für biochemische Untersuchungen wurde dennoch zur Sicherheit auch eine völlig fibroblastenfreie Muskelzelllinie (L6-Zellen) mit untersucht. Diese Zellen sind chemisch transformierte Myoblasten aus dem Skelettmuskel der Ratte (Yaffe, 1968). Obwohl es sich um eine permanente Zellinie handelt, haben diese Muskelzellen, bezogen auf ihr Proteinbiosynthese, sowie ihr Wachstums- und Differenzierungsverhalten viele Eigenschaften "normaler" Myoblasten beibehalten.

Trotz vieler Nachteile, die das Arbeiten mit einer Zellinie besonders bei der Interprätation der Daten im Vergleich mit normalen Zellen mit sich bringt, erschien es notwendig, völlig fibroblastenfreie Zellen in die Untersuchung mit einzuschließen. Ausschlaggebend hierfür waren verschiedene unserer immunhistochemischen Ergebnisse (s. 4.3), die darauf hin deuteten, daß neben den echten Fibroblasten die Myoblasten mit fibroblastenartiger Morphologie stärker zur Matrixsynthese beitragen, als die typisch spindelförmigen Muskelzellen.

Für alle nachfolgenden Untersuchungen über die Kollagenbiosynthese der Muskelzellen wurden Massenklonkulturen vom Huhn, der Wachtel, der Maus und dem Menschen verwendet. Massenkulturen wurden nur verwendet, wenn rein proteinchemische Fragestellungen vorlagen, bei denen es auf eine größere Proteinmenge und nicht auf dessen Herkunft ankam. Daneben wurden Massen- und Klonkulturen der L6-Muskelzelllinie sowie von Muskelfibroblasten der Maus hinsichtlich ihrer Proteinsynthese analysiert.

3. Biosynthese der interstitiellen Matrixproteine

3.1 Synthese von Typ V Kollagen

Untersuchungen über die Typ I und III Kollagensynthese waren schon von J. Sasse durchgeführt worden. Aus seinen Arbeiten ging hervor, daß auch die Myoblasten selbst an der

Ausbildung der Muskelgewebsmatrix beteiligt sind. Er konnte beide Proteine in gereinigten Wachtelmyoblasten nachweisen und zeigte zudem, daß diese Kollagene nur von den einkernigen Zellen und nicht von den Myotuben produziert werden (Sasse et al., 1981).

Unsere Immunfluoreszenzbefunde an Schnitten von Maus-, Wachtel- und Hühnermuskulatur deuten nun auch auf einen relativ hohen Typ V Anteil im Endomysium des Muskelgewebes, in unmittelbarer Nachbarschaft also zu den Myotuben (Abb. 3,c), hin. Da auch das Typ V Kollagen in Muskelzellkulturen erst nach dem Einsetzen der Fusion in größeren Mengen beobachtet worden war (Bailey et al., 1979), stellte sich wiederum die Frage nach seiner Herkunft. Fibroblasten, einkernige Myoblasten und Myotuben kamen als Quelle für dieses Protein in Betracht.

Um nachzuweisen, daß Myoblasten Typ V Kollagen produzieren, wurden Wachtelzellen in geringen Dichten für Massenklonkulturen ausgesät und nach 3 bis 5 Tagen mit ^{3}H-Prolin oder ^{14}C-Glycin in komplettem Medium in Gegenwart von Ascorbat radioaktiv markiert. Medium und Zellen wurden nach 24 h zur Überführung des gesamten Prokollagens in Kollagen mit Pepsin behandelt, und anschließend durch SDS-Gelelektrophorese analysiert (Sasse et al., 1981).

Abb. 5 zeigt die pepsinbehandelten Medien von Massenklonkulturen und Massenkulturen von Wachtelmuskelzellen. Neben größeren Mengen der α1(I)- und α2(I) Ketten aus Typ I Kollagen findet man die A- und B-Banden (α2(V) und α1(V))

des Typ V Kollagens (Abb. 5,a). Die Massenklonkulturen (Abb. 5,b,c) zeigen eine zusätzliche Bande, die entweder die α1(III) oder die α3(V)-Kette des Typ V darstellt (Sage und Bornstein et al., 1979).

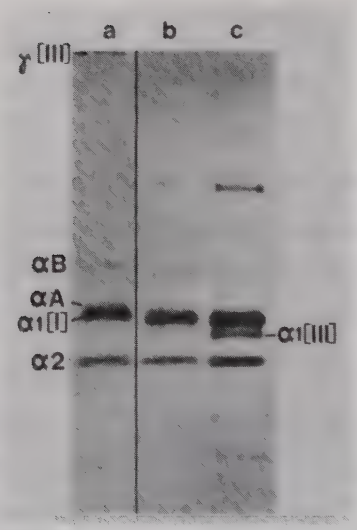


Abb. 5

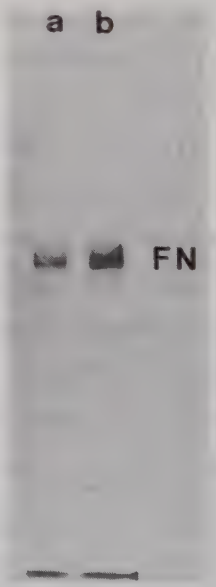


Abb. 6

Abb.5: 5 % SDS-Gelelektrophorese von ^{3}H-markierten Kollagenen aus dem Medium von Wachtelmuskelzellen nach Pepsinbehandlung. (a-b) Klonkulturen, unreduziert (a) und reduziert (b); (c) Massenkultur, reduziert.

Abb.6: 5 % SDS-Gelelektrophorese nach Immunpräzipitation von ^{14}C-markiertem Fibronektin aus dem Medium (a) und dem 0,5 M NaCl Extrakt (b) von Wachtelmuskelzellen nach Reduktion.

Zusätzlich wurden primär erhaltene Myoblastenklone aus Hühnermuskulatur - charakterisiert durch Ausbildung mehrkerniger Myotuben - mit Trypsin abgelöst und subkloniert. Die neu ausgesäten Zellen wurden mit Klonringen umgeben und die sekundären Klone nach erneut einsetzender Fusion ebenfalls markiert. In diesen Fällen wurden Medium und Zellen gemeinsam untersucht.
Auch in diesen echten Klonkulturen ließ sich das Typ-V Kollagen durch Immunpräzipitation eindeutig nachweisen (nicht gezeigt).

3.2 Synthese des Fibronektins

Fibronektin wird in großen Mengen im Bindegewebe des Muskels angetroffen. Obwohl die meisten Zellen dieses Protein synthetisieren, berichtete Chiquet, daß dies für Myoblasten nicht zutrifft (Chiquet et al., 1978). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu unseren eigenen Immunfluoreszenzdaten in Zellkulturen.

Der Nachweis des Fibronektins erfolgte durch Immunfluoreszenz und Immunpräzipitation mit anti-Fibronektin Antikörpern aus dem Medium und den Zellextrakten von Klonkulturen nach radioaktiver Markierung der Zellen. Die Präzipitate von Wachtel-, Huhn-, Maus- und L6-Myoblasten enthielten eine hochmolekulare Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 220 000 die im SDS-Gel die gleichen Laufeigenschaften aufwies, wie das aus Serum isolierte Fibronektin (Abb. 6).

4. Intrazelluläre Immunfluoreszenz

Neben den Fibroblasten sind also auch die Myoblasten selbst zur Synthese der wichtigsten Matrixkomponenten fähig. Dabei stammen das Typ I und III Kollagen überwiegend aus den sich teilenden Myoblasten und nicht von den Myotuben (Sasse et al., 1981). Dieser Befund wurde durch intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung erhalten und steht im Gegensatz zu den schon erwähnten Beobachtungen von Mayne und Bailey, die beide Proteine biochemisch erst nach einsetzender Fusion der Myoblasten in größeren Mengen nachweisen konnten. Auch Typ V Kollagen und Fibronektin wurde in Massenkulturen vor allem nach Einsetzen der Fusion gefunden. Da es nicht möglich war, Kulturen mit reinen Myotuben zu erhalten, versuchte ich auch in diesem Fall, den zellulären Ursprung beider Proteine mit Hilfe der intrazelllulären Immunfluoreszenz nachzuweisen.

Abb.7: Immunfluoreszenzfärbung intrazellulärer Proteine in Wachtel- (a-c, g-i), Human- (d) und L6-Muskelzellkulturen (e-f): Die Zellen wurden mit 70% Alkohol fixiert und vor der Anfärbung luftgetrocknet. Alle Marixproteine werden nur von den einkernigen Muskelzellen synthetisiert, nicht von den Myotuben (M); fibroblastenartige Zellen (F) zeigen häufig eine stärkere intrazelluläre Fluoreszenz, als spindelförmige Myoblasten (S).
Wachtelzellen angefärbt mit anti Typ I- (a,e), anti Typ V-Kollagen (b,i) und anti Fibronektin (c,d). Bei der Färbung von Wachtelmuskelzellen mit anti Typ V Kollagen wird oftmals die Oberfläche der Myotuben mitgefärbt (i).
Humanmyoblasten angefärbt mit anti Fibronektin (d).
L6-Zellen angefärbt mit anti Typ I Kollagen (e) und anti Fibronektin (f).
Doppelanfärbung von Wachtelzellen mit Antikörpern gegen Typ I Kollagen (g) und Aktin (h).
Vergr.: x960

a
b
c
d
e
f
g
h
i

Die Zellkulturen wurden mit Alkohol fixiert und anschließend getrocknet. Hierdurch brechen die Zellmembranen auf und ermöglichen ein Eindringen der Antikörper. Es wird also der intrazelluläre Pool an neu synthetisiertem Material erfaßt und kann einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden.

Man muß aber berücksichtigen, daß auch die einkernigen Myoblasten selbst keine einheitliche Zellpopulation bilden. Nach mehreren Teilungszyklen verharren die Zellen einige Zeit in einem postmitotischen Zustand, bevor die Fusion eintritt. Diese Zellen produzieren bereits andere Proteine und Enzyme, als die proliferativen Zellen, so z.B. muskelspezifisches Aktin bzw. Myosin, und ähneln in dieser Beziehung bereits den Myotuben.

Die Unterscheidung zwischen proliferativen und postmitotischen Zellen gelang durch Doppelmarkierungsexperimente mit Antikörpern gegen diese nur in bestimmten Differenzierungsstadien vorliegenden Proteine. Darüberhinaus ermöglichte diese Färbung auch Aussagen über den Synthesezeitpunkt bestimmter Komponenten. Wir verwendeten als spezifischen Marker für postmitotische Myoblasten und Myotuben muskelspezifisches Aktin, das weder in proliferativen Muskelzellen, noch in Fibroblasten vorkommt (Holtzer, 1959) (s. Kap. 5).

4.1 Primärzellkulturen

Färbt man Massen- bzw. Massenklonkulturen von primären Myoblasten mit Antikörpern gegen die Kollagene I, III und V an zeigen die meisten einkernigen Zellen eine positive Fluoreszenz (Abb. 7,a-b). In der Regel besitzen Myoblasten mit fibroblastenartiger Morphologie eine intensivere Färbung, als die bipolaren Muskelzellen (s. z.B. Abb. 7,a). Jedoch ist bekannt, daß sich aufgrund von Immunfluoreszenzergebnissen keine quantitativen Rückschlüsse auf die Proteinsyntheserate pro Zelle ziehen lassen (Herrmann et al., 1980).

Die mehrkernigen Myotuben wurden in fast allen Fällen nicht angefärbt (Abb. 7,a-b), synthetisieren diese Matrixproteine also nicht. Die manchmal beobachtete Reaktion der Myotuben mit Antikörpern gegen Typ V Kollagen ist wahrscheinlich auf die Zelloberfläche begrenzt, da die diffuse Färbung, im Gegensatz zur echten intrazellulären Fluoreszenz, auch über die Zellkerne hinweg verläuft, und beim Durchfokussieren keine Fluoreszenz innerhalb der Zellen nachweisbar ist (Abb. 7,i).

Auch Fibronektin wird nur von den einkernigen Zellen synthetisiert und nicht von den Myotuben (Abb. 7c,d) Im Gegensatz zu den Kollagenen läßt es sich aber nur in etwa 20-40 % der einkernigen, spindelförmigen Maus- und Wachtelzellen lokalisieren (Abb. 7,d). Wegen der raschen Sekretion des synthetisierten Fibronektins und des dadurch ungenügenden intrazellulären Pools ist es bei bestimmten

Zelltypen jedoch häufig schwierig, eine gute intrazelluläre Fluoreszenz zu erhalten (Hynes und Yamada, 1982). Das Ausbleiben einer intrazellulären Reaktion ist also nicht unbedingt gleichbedeutend damit, daß die nicht gefärbten Zellen dieses Protein nicht synthetisieren. Muskelzellen aus humanem Gewebe, die offensichtlich eine geringere Sekretionsraten aufweisen, sind z.B. zu 60 - 70 % positiv (Abb. 7,c).

4.2 L6-Zellen

Zellen der L6-Rattenmuskelzellinie synthetisieren wie die Primärzellen Typ I und III Kollagen (s. Abb. 7,e). Für die Färbung des Typ V Kollagens standen keine Antikörper zur Verfügung, die mit Rattenkollagen Typ V kreuzreagierten, so daß dessen Nachweis nicht möglich war.

Im Gegensatz zu den Maus- und Wachtelmyoblasten zeigen die L6-Zellen eine intensive Färbung mit Fibronektinantikörpern, die in praktisch allen Zellen auftritt (Abb. 7,f).

4.3 Fibroblasten

Auch Hühner-, Maus- und Humanmuskelfibroblasten synthetisieren alle vier Matrixproteine. Alle Zellen reagieren mit den Antikörpern gegen die untersuchten Proteine positiv (nicht gezeigt).

5. Abhängigkeit der Kollagensynthese vom Differenzierungszustand der Myoblasten

Eine Erklärung dafür, warum nur relativ wenige Myoblasten in älteren, primären Massenkulturen Kollagene und Laminin synthetisieren, ergab sich aus Doppelmarkierungsexperimenten, in denen die Zellen zusätzlich mit Antikörpern gegen muskelspezifisches Aktin angefärbt wurden. Dieser Antikörper reagiert wie erwähnt nur mit postmitotischen Myoblasten und Myotuben, nicht dagegen mit teilungsfähigen Muskelzellen oder Fibroblasten.

Aus Abb. 7,g-h wird am Beispiel des Typ I Kollagens ersichtlich, daß sich keine der Zellen mit beiden Antikörpern gleichzeitig anfärben läst. Muskelzellen synthetisieren die Matrixproteine also nur, solange sie sich noch teilen. Erreichen sie den postmitotischen Zustand oder fusionieren sie, wird die Biosynthese für Matrixproteine gestoppt.

Dies gilt nicht nur für das gezeigte Typ I Kollagen, sondern allgemein für alle Matrixkomponenten, also auch für Typ III, IV und V Kollagen sowie für Fibronektin und Laminin (s. Abb. 12).

6. Extrazelluläre Verteilung der interstitiellen Matrixproteine

Die von den Muskelzellen produzierten Matrixproteine werden zum größten Teil in das Medium sekretiert (Lipton,

1977b); für die verschiedenen genetischen Kollagentypen bestehen jedoch unterschiedliche Sekretionsraten (Sasse, 1981). Welcher Anteil hiervon in die unlösliche Matrix eingebaut wird und wieviel Protein von den Zellen direkt in die Matrix abgelagert wird, ist unbekannt. Zumindest für Fibronektin konnte auch ein Einbau des löslichen Proteins in die ECM nachgewiesen werden (Hayman und Rouslathi, 1979).

Der Einbau von interstitiellen Kollagenen und Fibronektin in eine quervernetzte Matrix, wie man sie auch im Muskelgewebe vorfindet, kann als Modellsystem für die Ausbildung des Endomysiums angesehen werden. Immunfluoreszenzuntersuchungen in Muskelzellkulturen könnten somit Aufschluß über die Fibrillenbildung der Matrixproteine im Gewebe geben. Zusätzlich bieten Doppelmarkierungsexperimente die Möglichkeit, Aussagen über den Ablagerungszeitpunkt bestimmter Komponenten und die Verteilung der einzelnen Proteine zueinander zu machen.

Die extrazelluläre Ablagerung der Proteine ist von den Dichten abhängig, in denen die Zellen ausgesät werden. Myoblastenmassenkulturen bilden nach etwa 1 - 2 Tagen ein dichtes extrazelluläres Netzwerk von Typ I, III und V Kollagen sowie Fibronektin aus (Abb. 8,a-d), das die einkernigen Zellen und die Myotuben umgibt. Die Oberfläche der Myotuben bleibt jedoch in jedem Fall frei. Ein ähnliches Bild zeigen auch Myoblastenklone, allerdings erst nach 7 bis 8 Tagen, sowie L6-Zellkulturen (Abb. 8,g-h). Während die Filamente der Matrix in jungen Kulturen eine zufällige

Orientierung aufweisen, findet man die Kollagen- und Fibronektinfibrillen zu späteren Zeitpunkten zwischen den Myotuben überwiegend parallel zu diesen angeordnet (nicht gezeigt).

Vaheri (1978) und Dessau (1978b) hatten gezeigt, daß in Fibroblastenkulturen zwischen Typ I bzw. III Kollagen und Fibronektin eine Gleichverteilung vorliegen, d.h. es wurden in Doppelfärbungsversuchen mit beiden Antikörpern identische Strukturen angefärbt.

Bei älteren Kulturen, die überwiegend aus fusionierten Muskelzellen bestehen, finden wir dagegen ein Muster, bei dem sich die Netzwerke von Typ I Kollagen und Fibronektin völlig unterscheiden (Abb. 8,e-f). Diese Ungleichverteilung ist jedoch umso weniger ausgeprägt, je mehr einkernige Zellen die Kultur noch enthält.

Abb.8: Extrazelluläre Verteilung der interstitiellen Kollagene in Wachtelmuskelzellen (a-f) und L6-Zellen (g,h): (a,g) Typ I-, (b) Typ III-, (c) Typ V Kollagen, (d,f) Fibronektin, (h) Laminin.
(e,f) Doppelfärbung mit Antikörpern gegen Typ I Kollagen (e) und Fibronektin (f). In jungen Myoblastenkulturen liegt eine Gleichverteilung beider Proteine vor, während sich die Netzwerke in den hier gezeigten älteren Kulturen oftmals stark unterscheiden.
Vergr. (a) x960, (b-h) x380.

a
b
c
d
e
f
g
h

7. Bioynthese der Basalmembranproteine

7.1 Primärzellkulturen

7.1.1 Synthese von Typ IV Kollagen

Massenkulturen von Mausmuskelfibroblasten sowie Massenklonkulturen von Wachtel- und Mausmyoblasten wurden 12 - 24 h mit ^{14}C-Glycin und/oder ^{3}H-Prolin inkubiert. Die Markierung der myogenen Klone erfolgte nach 5 bis 8 Tagen, die der Fibroblasten 2 bis 3 Tage nach der ersten oder zweiten Passage. Der Nachweis des neu synthetisierten Proteins gelang durch Immunpräzipitation mittels spezifischer Antikörper (Herstellung und Reinigung s. Material und Methoden, Kap. 7) aus dem Kulturmedium und den Zellextrakten.

Die Medien aller untersuchten Zelltypen zeigten nach elektrophoretischer Auftrennung des mit anti-Typ IV Kollagen erhaltene Präzipitats ein Bandendoublet mit MG 185 000 und 175 000 in der charakteristischen Position von pro α(1)IV und pro α(2)IV (Abb. 9 c,d). Auch Immunpräzipitationen aus Zellextrakten von L6-Zellen zeigten das gleiche charakteristische Bandendoublet mit denselben Molakulargewichten (Abb. 9,f). Beide Banden lassen sich mit bakterieller Kollagenase abbauen (Abb. 9e, sind aber unempfindlich gegen Pepsin (nicht gezeigt).

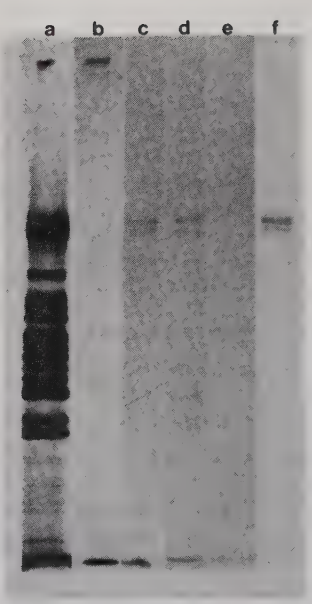


Abb. 9

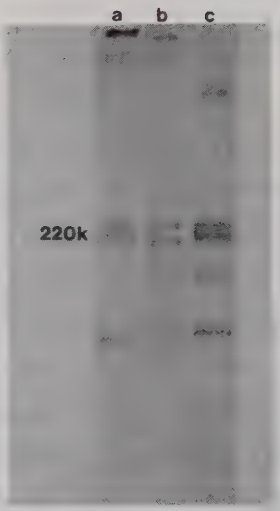


Abb. 10

Abb.9: Immunpräzipitation von Typ IV Kollagen aus Medium und Zellextrakten von Muskelzellen aus Massenklonkulturen von Mäusezellen: 8-12 Tage alte Kulturen wurden 24 Std. mit ^{14}C-Glycin markiert und das neu synthetisierte Typ IV Kollagen mit spezifischen Antikörpern, gefolgt von Pansorbin A, gefällt. Nach Auftrennen der reduzierten Proben auf einem 5% Gel wurden die Banden fluorographisch lokalisiert. (a) Medium von Fibroblasten in der zweiten Passage (10 Tage in Kultur). (b) Kontrolle mit Nichtimmunglobulin vom Kaninchen, Präzipitat mit Typ IV Antikörpern aus Muskelzellmedium (c), aus Fibroblastenmedium (d), (e) wie in (d), aber nach Inkubation mit gereinigter Kollagenase, (f) Typ IV Präzipitat aus dem Zellextrakt von L6-Zellen.

Abb.10: Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Laminin aus dem Medium von ^{14}C-Glycin markierten Massenklonkulturen von Mausmuskelzellen nach Fluorographie des 5% SDS-Gels. Die Proben wurden mit 5 % Mecaptoäthanol reduziert. (a) Myoblasten, (b) Fibroblasten, (c) L6-Zellen.

7.1.2 Synthese von Laminin

Die Immunpräzipitationen aus Medien und Zellextrakten mit Antikörpern gegen Laminin zeigen in der Gelelektrophorese ein Doublet im Molekulargewichtsbereich 220 000 (Abb. 10, a-c). Die 440K-Untereinheit des Laminins wurde zwar im Medium von L6-Zellen (Abb. 10a) nicht dagegen in Medien und Zellextrakten von Primärzellkulturen gefunden. Warburton et al. (1982) haben dies einer unvollständigen Penetration der 440 K-Untereinheit in das Gel zugeschrieben; es gibt allerdings auch Berichte, in denen gezeigt wird, daß die 220 K und 440 K Banden unabhängig voneinander synthetisiert werden können (Cooper et al., 1981). Daneben kann auch ein enzymatischer Abbau der gegen Proteasen empfindlicheren 440K-Einheit des Laminins hierfür verantwortlich sein (Timpl, pers. Mitt.).

Im Allgemeinen enthält das Medium eine zusätzliche, mit dem Antikörpern kreuzreagierende Bande vom MG 150 000 (Abb. 10,a-c). Bisher ist nicht geklärt, ob es sich um die von Hogan (1980) beschriebene PYS-C Bande handelt, ein Protein, das von Carlin et al. (1981) auch als Entaktin bezeichnet wurde, und das durch verschiedene anti-Laminin-antikörperpräparationen mitgefällt wird (Hogan et al., 1980), oder um ein Abbauprodukt des Laminins. Für die letztere Annahme spricht die Beobachtung, daß ein Verschwinden der 440 K-Untereinheit häufig mit einer Zunahme der 150 K Bande während der Lagerung von Laminin-Immunpräzipitaten korreliert.

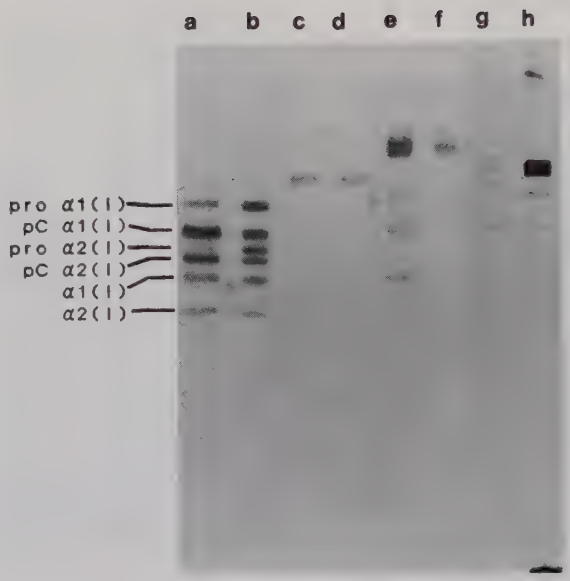


Abb.11: Immunpräzipitationen aus Medium (a,c,e,g) und Zellextrakten (b,d,f,h) von ^{14}C-Glycin markierten L6-Zellen nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem 5 % SDS-Polyacrylamidgel. Präzipitate mit Antikörpern gegen Typ I (a,b) und IV (c,d) Kollagen, Fibronektin (e,f) und Laminin (g,h). Die zusätzlichen Banden in (e) stellen warscheinlich Abbauprodukte des Fibronektins dar, die aus dem Zellkulturmedium mitgefällt wurden.

7.2 Untersuchungen an einer Myoblasten-Zellinie

Analog den Primärzellen synthetisieren die L6-Zellen neben den interstitiellen Kollagenen I und III auch Fibronektin und die Basalmembrankomponenten Laminin und Typ IV Kollagen.

Abb. 11 zeigt den Nachweis von Typ I und IV Kollagen

sowie Laminin und Fibronektin im Zellextrakt und im Medium. Mit Antikörpern gegen Laminin lassen sich alle drei charakteristischen Untereinheiten dieses Proteins mit den Molekulargewichten 440 K, 220 K und 150 K präzipitieren (Abb. 11 g,h). Mit Antikörpern gegen Typ I Kollagen werden die verschiedenen Prokollagenketten und intermediären Abbaustufen der Prokollagenketten präzipitiert (Abb. 10a,b). Das Immunpräzipitat mit anti-Fibronektin zeigt zusätzlich zu der Fibronektinbande vom MG 220 000 noch einige proteolytische Fragmente (Abb. 11e).

7.3 Synthese der Basalmembranproteine in Fibroblastenkulturen

Auch Fibroblasten vom Mausmuskel produzieren neben den interstitiellen Kollagenen Typ IV Kollagen und Laminin. Das mit anti-Typ IV erhaltene Immunpräzipitat aus dem Medium von Fibroblasten enthält neben den beiden Typ IV Kollagenketten noch zwei weitere Proteine mit Molekulargewichten von 90 K und 100 K (Abb. 9,d). Da auch diese beiden mit dem Antikörper kreuzreagierenden Banden empfindlich gegen bakterielle Kollagenase sind (nicht gezeigt), nehmen wir an, daß es sich bei ihnen um Abbauprodukte von $\alpha 1$(IV) und $\alpha 2$(IV) handelt.

Mit Antikörpern gegen Laminin lassen sich wiederum nur die MG 220 000 und die MG 150 000 Untereinheiten dieses Proteins nachweisen (Abb. 10, b). Für das Fehlen der 440 000er Einheit dürften die bereits bei den primären

Myoblasten diskutierten Gründe verantwortlich sein (s. 7.2).

8. Intrazelluläre Immunfluoreszenz

Normalerweise werden Basalmembranen von den darunterliegenden epitheloiden oder endotheloiden Zellen synthetisiert. Aus Arbeiten von Lipton (1977a) ging jedoch hervor, daß in Muskelzellkulturen eine Basalmembran auf Myotuben nur ausgebildet wird, wenn Fibroblasten zugegen sind. Um die Frage nach dem Ursprung des Typ IV Kollagens und Laminins zu klären, wurden fibroblastenhaltige Massenkulturen von Muskelzellen mit Antikörpern gegen Laminin und Typ IV intrazellulär angefärbt.

8.1 Primärmuskelzellen

Von den einkernigen Zellen zeigten wiederum die fibroblastenartigen Muskelzellen die intensivere Färbung, aber auch bipolare Zellen wiesen in der Immunfluoreszenz eine positive Reaktion mit den Antikörpern auf (Abb. 12,a-f). Dennoch ließen sich in Massenkulturen von den typisch spindelförmigen Myoblasten häufig nicht alle Zellen anfärben. In jungen Klonkulturen werden beide Proteine dagegen von nahezu allen Myoblasten synthetisiert (Abb. 12,c-d).

Überaschenderweise zeigten die Myotuben keine intrazelluläre Fluoreszenz (Abb. 12,d,f). Obwohl gerade sie diese beiden Proteine für den Aufbau ihrer Basalmembran benötigen,

a
b
c
d
e
f
g
h

scheinen sie diese Komponenten nicht selbst zu produzieren.

8.2 L6-Zellen

L6-Zellen verhalten sich auch in diesem Fall wie die Primärzellen. Nur die proliferativen Zellen, nicht die Myotuben, synthetisieren die 4 Matrixproteine. Der Anteil der positiv reagierenden spindelförmigen Myoblasten liegt in Massenkulturen jedoch wesentlich höher und entspricht der Färbung von jungen Wachtelklonen oder Fibroblastenkulturen (Abb. 12, e-f).

8.3 Fibroblasten

Auch die Fibroblasten synthetisieren Bestandteile der muskulären Basalmembranproteine. Abb. 12,g-h zeigt, daß Laminin und Typ IV Kollagen von nahezu allen Zellen produziert werden.

Abb.12: Intrazelluläre Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Basalmembranproteine: (a,b) Mausmassenkultur, (c,d) Mausklonkultur, (e,f) L6-Zellen, (g,h) Mausmuskelfibroblasten. Die Zellkulturen wurden mit Antikörpern gegen Laminin (a,c,e,g) und Typ IV Kollagen (b,d,f,h) gefärbt. Fibroblastenartige Zellen (F) zeigen wiederum eine intensivere Fluoreszenz, als die spindelförmigen Myoblasten (S). Die Myotuben (M) sind in allen Fällen nicht angefärbt. Vergr. (a-b,g-h) x1600, (c-f) x960.

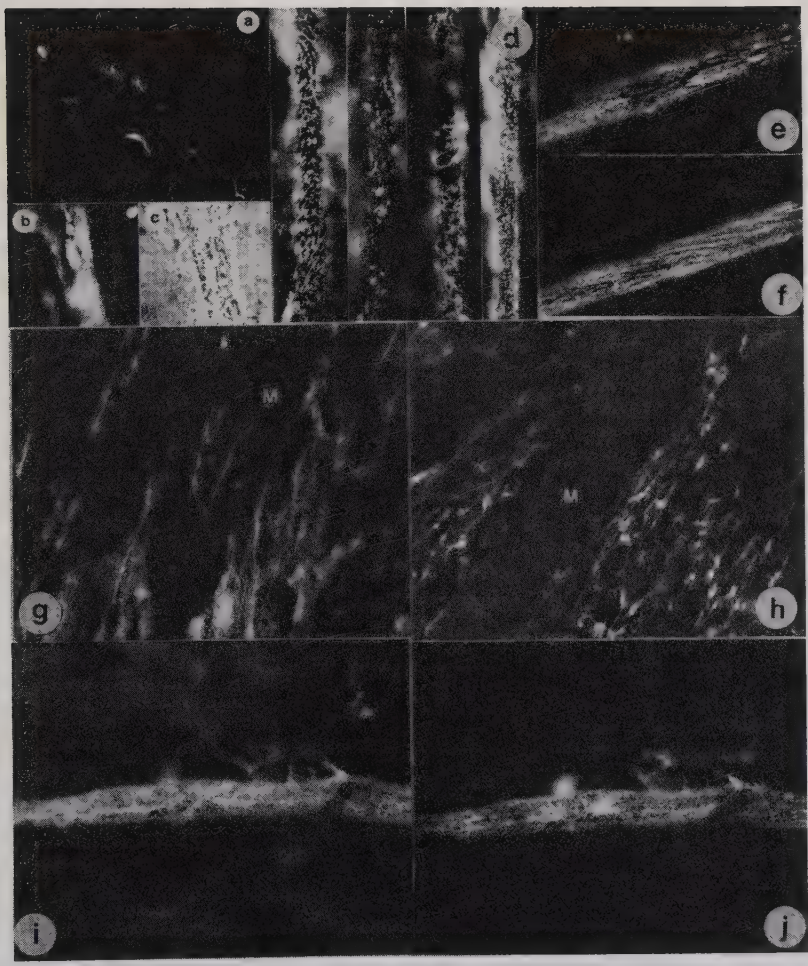
9. Extrazelluläre Verteilung von Laminin und Typ IV Kollagen

Betrachtet man die extrazelluläre Verteilung von Laminin und Typ IV Kollagen in Myoblastenkulturen vor dem Einsetzen der Fusion, so findet man erhebliche Unterschiede zu der der interstitiellen Matrixproteine. Beide werden von den Fibroblasten, L6-Zellen und den unfusionierten Myoblasten synthetisiert und in einem extrazellulären Netzwerk abgelagert, doch ist die Menge von der Zelldichte und dem Zelltyp abhängig. Je später die Fusion einsetzt, und dies betrifft besonders die L6-Zellen, umso stärker ausgeprägt ist die abgelagerte Matrix.

In Kulturen fusionierter Myoblasten ist dagegen das fibrilläre Netzwerk nur spärlich ausgebildet. Dafür findet man Laminin und Typ IV in einem punkt- oder streifenförmigen Muster auf der Oberfläche der Myotuben sowie unterhalb der Muskelschläuche zwischen diesen und dem Substrat (Abb. 13,a-f).

Die Fluoreszenz auf der Zelloberfläche tritt frühestens 3 bis 4 Tage nach Beginn der Fusion auf. Innerhalb der nächsten 2 bis 3 Wochen wird das fleckenförmige (Laminin) bzw. streifenförmige (Typ IV) Muster stärker ausgebildet, ohne jedoch in eine kontinuierliche Schicht überzugehen. Auch in 5 bis 6 Wochen alten Kulturen bleibt das in Abb. 13,d-f gezeigte Bild erhalten.

Myoblastenklone zeigen ebenfalls ein ähnliches


a
b
c
d
e
f
M
g
M
h
i
j

Lamininmuster auf ihren Myotuben; es ist im Vergleich mit den Massenkulturen aber wesentlich schwächer ausgeprägt (Abb. 13,a-b).

L6-Zellen sind offensichtlich nicht in der Lage, die von ihnen synthetisierten Proteine in nennenswerter Menge auf ihrer Oberfläche abzulagern. Bei ihnen läßt sich vor allem extrazelluläres Material zwischen den Myotuben nachweisen (Abb. 13,g-h).

Doppelfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen Laminin und Typ IV Kollagen zeigt die Abb. 13,i-j. Über weite Bereiche der Myotubenoberflächen sind die beiden Proteine gleichverteilt, doch lassen sich auch kleinere Bezirke finden, in denen sich die Proteinverteilung unterscheidet.

Abb.13: Extrazelluläre Verteilung der Basalmembranproteine Laminin und Typ IV Kollagen.
(a-b) Wachtelzellklon angefärbt für Laminin, (c) Phasenkontrast zu (b).
(d) Wachtelmassenzellkultur angefärbt für Laminin,
(e-f) Mausmassenzellkultur angefäbt für Laminin (e) und Typ IV Kollagen (f),
(g-h) L6-Zellen angefärbt für Laminin (g) und Typ IV Kollagen (h),
(i-j) Doppelfärbung einer Mausmassenzellkultur für Laminin (i) und Typ IV Kollagen (j). Vergr. (a, d-j) x960, (b,c) x1600.

10. Typ V Prokollagen

Neben den basalmembranspezifischen Proteinen Typ IV Kollagen und Laminin hatten wir in der Immunfluoreszenz häufig auch Typ V Kollagen auf der Oberfläche der Myotuben beobachtet (s. Abb. 7,i). Das angefärbte Muster war diffus, und klare Strukturen wie z.B. beim Laminin, fehlten. Da eine derartige Färbung nicht in allen Experimenten auftrat, nahmen wir zunächst eine unspezifische Reaktion an, verursacht durch die Kulturbedingungen oder den Antikörper.

Das Typ V Kollagen ist den interstitiellen Kollagenen I, II und III in vielerlei Hinsicht sehr ähnlich. Dennoch ist seine macromolekulare Struktur unbekannt und man weiß nicht, ob es in Geweben in ähnlichen Fibrillen vorliegt, wie die interstitiellen Kollagene. Auch sein Vorkommen innerhalb verschiedener Gewebsstrukturen ist nicht restlos geklärt. So wird das Typ V Kollagen von einigen Autoren als Bestandteil von Basalmembranen angesehen (Roll und Madri, 1982).

Im Gegensatz zum fibrillären Auftreten der interstitiellen Kollagene liegt das Typ IV Kollagen in einer raumnetzartigen Struktur vor (Kühn et al., 1981), in die es als Prokollagen, also ohne Abspaltung seiner globulären Propeptide eingebaut ist (Timpl et al., 1981; Tryggvason et al., 1982; Wartiovaara und Leivo, 1982). Die Propeptide sind für die Verknüpfung zweier Kollagenketten an ihrem carboxyterminalen Ende notwendig. Sollte das Typ V Kollagen

ebenfalls in Basalmembranen vorkommen, wäre ein ähnliches Netzwerk und somit ein Einbau als Prokollagen in die Matrix denkbar. In diesem Fall müßte man annehmen, daß in Muskelzellkulturen die Abspaltung der Propeptide unterbleibt und somit in Kulturen die nichtprozessierten Vorläuferstufen dieses Kollagentyps nachweisbar sind.

Da das Typ V Prokollagen zu Beginn unserer Untersuchungen noch nicht isoliert war, interessierte uns zunächst, ob dieser Kollagentyp in Muskelzellkulkturen in einer Vorläuferform synthetisiert und sekretiert wird. Sollte es gelingen, das Prokollagen nachzuweisen und zu isolieren, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden, ob eine normale Abspaltung der Propeptide stattfindet, oder ob im Muskelsystem diese Abspaltung blockiert ist.

Erste Hinweise auf das Vorliegen einer Typ V Precursorform in Muskelzellen hatten sich aus Untersuchungen von NaCl-Präzipitaten der Muskelzellkulturmedien ergeben. Es wurden auf dem SDS-Gel Banden gefunden, die nach Pepsinabbau in die beiden Typ V spezifischen A- und B- Banden überführt wurden (H. v.d.Mark, unveröffentl.).

Die Existenz eines aus zwei unterschiedlichen α-Ketten aufgebauten Prokollagens wurde dann wenig später auch in der glatten Muskulatur des Kropfmagens vom Huhn gezeigt (Kumamoto und Fessler, 1980). Weitere Untersuchungen in diesem System ergaben, daß die Konversion des Typ V Prokollagens in Typ V Kollagen durch eine rasche Abspaltung der carboxyterminalen Telopeptide eingeleitet wird und zu

den pC(V) Ketten führt (Kumamoto und Fessler, 1981; Fessler et al., 1981a). Aus diesen entsteht in einem langsameren Schritt unter Freisetzung disulfidgebundener P-Peptide (MG 35000), das eigentliche Typ V Kollagen, das noch pepsinempfindliche Regionen enthält und somit größer ist, als das üblicherweise mit Pepsin aus Geweben extrahierbare Material (A- und B-Ketten).

10.1 DEAE-chromatographischer Nachweis des Typ V Prokollagens

Die Umwandlung der Pro-Formen in die Kollagene wird außer von spezifischen Prokollagenpeptidasen durch eine Reihe unspezifischer Proteasen katalysiert. Wegen der Instabilität der Prokollagene und der geringen Syntheseleistung der Muskelzellen versuchten wir deshalb, das Protein zunächst durch DEAE-chromatographische Schritte anzureichern, bzw. es in rein qualitativen Maßstab durch Immunpräzipitation nachzuweisen.

Zur Isolierung des Prokollagens wurden Massenkulturen von Wachtel- oder Hühnermuskelzellen 12 - 24 h mit ^{14}C-Glycin markiert und Medium oder Zellextrakt auf DEAE-Cellulose chromatographiert (Abb. 14). Mit einem Salzgradienten (0 - 300 mMol NaCl), gefolgt von 1 M NaCl wurden 6 Fraktionen von der Säule eluiert und durch SDS-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 15).

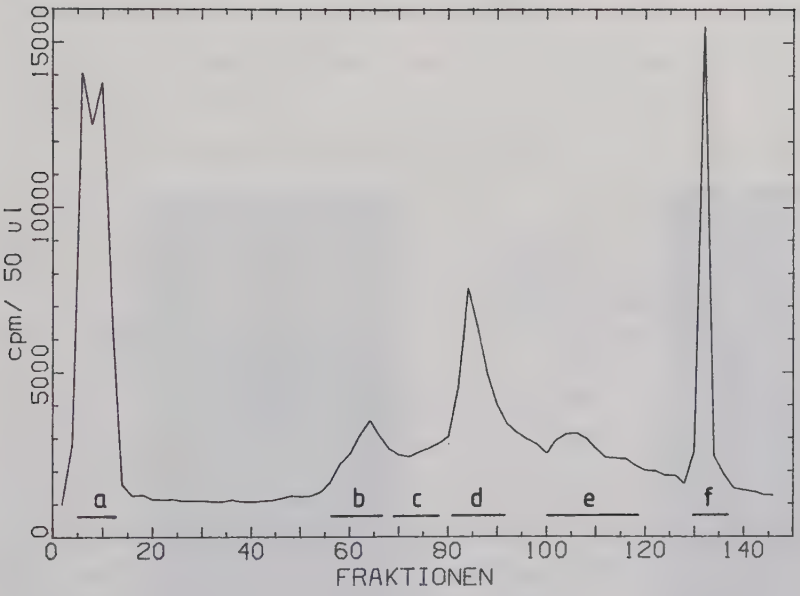


Abb.14: DEAE-chromatographische Isolierung von Typ V Prokollagen. Medium von Hühnermuskelzellen wurde mit ^{14}C-Glycin radioaktiv markiert und auf eine DEAE-Säule aufgetragen. Peak (a) Durchlauf, Peak (b) bis (e) mit Gradienten (0-300mM NaCl) eluiertes Material, Peak (f) 1M NaCl-Eluat.

Nach Reduktion des mit geringen Salzkonzentrationen eluierten Materials (Fraktion c) sind die beiden Prokollagenketten pro α1(V) und pro α2(V) sowie die nach Abtrennen der C-terminalen Telopeptide erhaltenen pα1(V) und pα2(V) erkennbar (Abb. 15,b). Daneben findet man zusätzlich die Vorläuferformen von Typ I und III Kollagen, die auch in

den anderen Fraktionen enthalten sind (Abb. 15,a-b). Das 1 M NaCl-Eluat (Fraktion f) enhält nur Typ V Kollagen und seine Precursor; man findet die proα, die pα sowie die α1- und α2-Ketten (A- und B-Ketten) dieses Kollagentyps (Abb. 15,c).

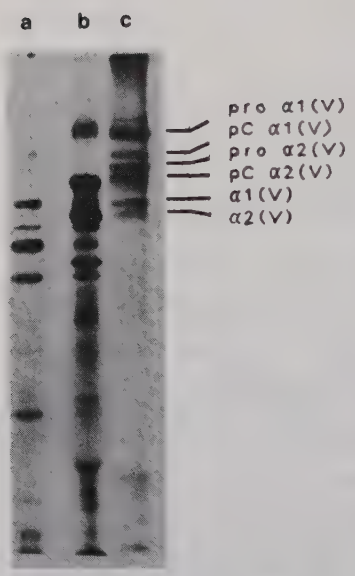


Abb. 15

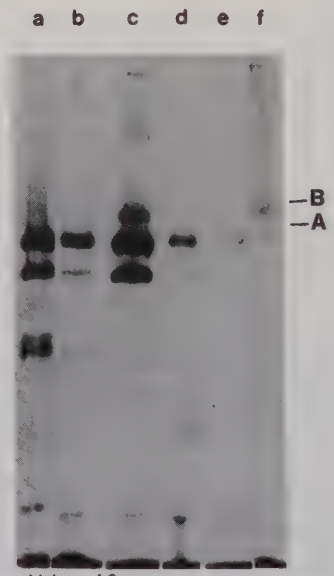


Abb. 16

Abb.15: Autoradiographische Analyse von der DEAE-Cellulosechromatographie (Abb. 14) erhaltenen Fraktionen: (a) Durchlauf, (b) bei geringen NaCL-Konzentrationen im Gradienten eluiertes Material, (c) 1 M NaCl-Eluat.

Abb.16: Pepsinabbau der Fraktionen der DEAE-Cellulosechromatographie aus Abb. 14 (a) Durchlauf, (b-e) mit Gradienten eluiertes Material, (f) 1M-NaCl Eluat.

Durch Pepsinbehandlung werden die globulären Anteile der Ketten abgespalten und das Prokollagen in das pepsinresistente Kollagen überführt. Dieses ist etwas kleiner, als das in Geweben normalerweise gefundene Typ V Kollagen (Kumamoto und Fessler, 1980). Der größte Teil des Kollagens in den Fraktionen a bis d ist Typ I (Abb. 16,a-d). In der Fraktion des Peaks c findet man zusätzlich die A- und B-Ketten des Typ V Kollagens, die in Fraktion f (1 M NaCl-Eluat) ausschließlich vorhanden sind (Abb. 16,f).

10.2 Immunpräzipitation des Typ V-Prokollagens

Die Identifizierung von Typ V Prokollagen in Klonkulturen erfolgte nach radioaktiver Markierung mittels Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen Typ V Kollagen (Herstellung und Reinigung s. Material und Methoden, Kap. 7) aus dem Medium und dem 0.5 M NaCl-Zellextrakt. Das Immunpräzipitat des Zellextrakts zeigte im SDS-Gel ein Bandenmuster ähnlich dem des 1 M NaCl-Extraktes des Hühnerzellkulturmediums (Abb. 17,h). Ein analoges Präzipitat wurde auch aus dem Medium der Wachtelzellklone erhalten (Abb. 17,g).

10.3 Umwandlung der Precursorformen in Typ V Kollagen

Um das Entstehen des komplexen Bandenmusters weiter abzuklären und eventuell eine Zuordnung der Vorstufen zu den A- und B- Ketten treffen zu können, wurden Wachtelzellen für 90 min mit ^{14}C-Glycin markiert. Anschließend wurde

nichtradioaktives Glycin im Überschuß zugesetzt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten das Zellkulturmedium gesammelt. Die Medien wurden mit Proteaseinhibitoren versetzt und die Kollagenvorstufen und Umwandlungsprodukte mit Antikörpern gegen Typ V Kollagen präzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden nach elektrophoretischer Auftrennung fluorographisch analysiert und die Banden anhand der Ergebnisse von Kumamoto und Fessler identifiziert.

Es werden zunächst die beiden Prokollagenketten pro α1(V) und pro α2(V) synthetisiert die etwa im Verhältnis 2 : 1 vorliegen (Abb. 17,a). Im Laufe der Zeit nehmen die Abbauprodukte pα1(V) und α1(V) sowie pα2(V) und α2(V) zu (Abb. 17, b,c). Pro α2(V) und pα2(V) werden schneller abgebaut als die α1(V) Ketten (Abb. 17,d,e,f) was auch auch bei den Proteinen aus glatten Muskelzellen des Kropfes und Gefäßen beobachtet wurde (Kumamoto und Fessler, 1981; Fessler et al., 1981b). Nach ca. 240 min ist die pα2(V)-Vorläuferkette im Präzipitat verschwunden (Abb. 17,f). Die letzten Bahnen des Gels in Abb. 17 zeigen Immunpräzipitate aus Wachtelzellkulturmedium (g) nach einem 12 stündigen Puls und aus dem Zellextrakt von Hühnermuskelzellen (h). Hierin sind alle 6 Typ V Prokollagenpeptide und deren Abbaustufen erkennbar. Zusätzlich enthalten sie die A- und B-Ketten, die normalerweise nach Pepsinextraktion aus Geweben erhalten werden.

Auch bei den Typ V Prokollagenen findet nach den hier dargestellten Ergebnissen in Muskelzellkulturen eine normale

Abspaltung der Propeptide statt. Ein Einbau des Typ V Kollagens in die Basalmembranen kann also nicht auf die gleiche Weise erfolgen, wie beim Typ IV. Dagegen ist die Zusammenlagerung zu Fibrillen, analog denen der interstitiellen Kollagene, durch die Konversion begünstigt.

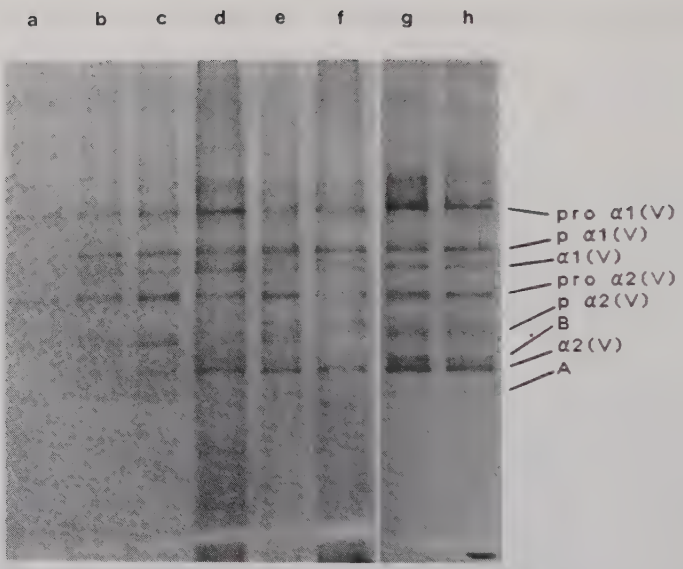


Abb.17: Umwandlung des Typ V Prokollagens in Typ V Kollagen.
Wachtelmuskelzellen wurden 90 min mit ^{14}C-Glycin markiert und der Abbau der Prokollagenketten nach Zugabe eines Überschusses an nichtradioaktivem Glycin verfolgt. Das Prokollagen und seine Umwandlungsprodukte wurden durch Antikörper gegen Typ V Kollagen nach 0, 30, 60, 90, 120 und 240 min präzipitiert, auf einem 5%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Banden durch Autoradiographie lokalisiert (a-f). (g) Immunpräzipitation mit Typ V Antikörpern nach 12 stündiger Markierung ohne Zugabe von nichtradioaktivem Glycin, (h) Immunpräzipitation aus dem 0,5 M NaCl-Extrakt von Hühnermuskelzellen.

Teil II: Zell-Matrix- und Zell-Zell-Wechselwirkungen im Skelettmuskel

EINLEITUNG

Im ersten Teil war gezeigt worden, daß die makromolekularen Bestandteile der extrazellulären Matrix des Skelettmuskels hauptsächlich von den einkernigen Zellen des Muskels, den Fibroblasten und den proliferativen Myoblasten, synthetisiert werden. Durch Immunfluoreszenzstudien wurde gezeigt, wie sich diese Komponenten *in vitro* zu Strukturen zusammenlagern, die dem Endomysium und der Basalmembran entsprechen.

Dem Endomysium des Muskels entspricht *in vitro* ein dicht verflochtenes fibrilläres Netzwerk aus interstitiellen Kollagenen (Typ I, III und V) und Fibronektin, in das die Zellen eingebettet sind. Typ IV Kollagen und Laminin werden dagegen auf den Myotuben abgelagert und bilden eine rudimentäre Basalmembran.

Im II. Teil dieser Arbeit wird die Affinität von Muskelzellen zu den makromolekularen Komponenten des Endomysiums und der Basalmembran untersucht. Das Muskelzellsystem war eines der ersten Beispiele, anhand dessen der Einfluß von Makromolekülen der extrazellulären Matrix auf die Zellentwicklung demonstriert wurde (Hauschka und Konigsberg, 1966). Es wurde gezeigt, daß die Ausbildung von fusionierten Muskelzellklonen durch Kultivierung auf kollagenbeschichteten Schalen stimuliert wird. Der Effekt

war von der Menge des zugesetzten Kollagens, nicht aber vom Kollagentyp abhängig (Ketley et al., 1976). Die Ergebnisse von Konigsberg, Hauschka und Ketley haben jedoch nur einen begrenzten Aussagewert, da die Ausbildung von Myotuben das Resultat verschiedener sich überlagernder Prozesse darstellt, wie Adhäsion der Zellen an das Substrat, Proliferation, Differenzierung und schließlich Fusion. Es war in diesen Untersuchungen nicht gezeigt worden, auf welchen dieser Teilprozesse Kollagen einen Einfluß hat. Zusätzlich wird die Interprätation der Befunde dadurch erschwert, daß die Myoblasten, wie im 1. Teil dieser Arbeit gezeigt, selbst beträchtliche Mengen an Kollagen produzieren, die den Effekt des exogenen Kollagens verfälschen oder aufheben können. Aus diesem Grund wird in diesem 2. Teil der Arbeit zunächst nur ein Aspekt dieses Fragenkomplexes untersucht, nämlich der der Adhäsion von Myoblasten an verschiedene Kollagentypen. Vor allem die Rolle der "Attachmentproteine" Laminin und Fibronektin steht dabei im Schwerpunkt der Untersuchungen. Obwohl direkte Zell-Kollagen-Wechselwirkungen möglich sind (Grinell, 1978; Goldberg, 1979; Chiang and Kang, 1979; Mollenhauer und v.d. Mark, 1983), benötigen die meisten mesenchymalen Zellen Fibronektin, um an Kollagensubstrate zu haften (Klebe, 1974; Kleinman et al., 1979a; Yamada, 1983).

Epithelzellen wie z.B. epidermale Zellen (Murray et al., 1978), Linsenepithelzellen (Sugrue und Hay, 1982) und Brustdrüsenepithelzellen (Terranova et al., 1980) binden nicht über Serumfaktoren an Kollagen. Sie heften sich bevorzugt an

Typ IV-Kollagen (Basalmembrankollagen) über das Glykoprotein Laminin. Keines der interstitiellen Kollagene kann Typ IV hierbei ersetzen (Timpl et al., 1978b; Murray et al., 1980; Terranova et al., 1980). Laminin wirkt in ähnlicher Weise wie Fibronektin, indem es sich zunächst an das Substrat anheftet. An diesen Komplex binden dann die Zellen.

Zusätzlich gibt es einige Zelltypen, die sich sowohl über Fibronektin an Typ I als auch über Laminin an Typ IV Kollagen anheften. Hierzu gehören Hepatocyten (Johansson et al., 1981) und einige Zellen metastatisierender Tumoren. Beide Attachmentproteine werden von diesen Zellen auch synthetisiert.

Derartige Attachmentproteine waren bei den Studien von Hauschka und Konigsberg (1966) noch nicht bekannt. Inzwischen berichteten Chiquet et al. (1978), daß sich auch Myoblasten über Fibronektin an die Typ I Kollagenmatrix anheften.

Auf der anderen Seite geht aus dem ersten Teil hervor, daß einkernige Muskelzellen und Myotuben über große Mengen von Laminin und Typ IV Kollagen auf ihrer Oberfläche verfügen. Die Zellerkennung und Adhäsion könnte also auch über eine dieser beiden Komponenten verlaufen.

Eine Möglichkeit, die Affinität zwischen Zellen und Matrixproteinen zu messen, besteht darin, Petrischalen mit verschiedenen Proteinen zu beschichten und die Absetzgeschwindigkeiten der Zellen auf diesen Substraten zu

vergleichen.

Um solche schnell verlaufenden Prozesse mit genügend großer Genauigkeit erfassen zu können, wurde ein Assay entwickelt, der es gestattete, mit geringen Zellzahlen auszukommen und darüberhinaus eine größere Anzahl von verschiedenen Substraten gleichzeitig miteinander zu vergleichen. Der erste Punkt war wichtig, weil hochreine Myoblasten nur in begrenzter Menge zur Verfügung standen. Die große Zahl verschiedener Substrate und Meßpunkte wurde notwendig, weil derartige Tests empfindlich von der Zellpräparation abhängen und somit viele Kontrollexperimente berücksichtigt werden mußten.

Da zum Austesten der optimalen Versuchsbedingungen nicht genügend fibroblastenfreie Primärmuskelzellen zur Verfügung standen, wurden die Versuche zunächst mit der permanenten L6-Myoblastenzellinie durchgeführt. Anhand ausgewählter Substrate wurden die Ergebnisse dann mit primären Zellen überprüft.

ERGEBNISSE

1. Durchführung der Attachmentassays

1.1 Vorbereitung der Microtiterplatten

Zellbindungsstudien wurden, sofern nicht anders angegeben, in Microtiterplatten durchgeführt. Die Beschichtung der Platten erfolgte durch Auftrocknen der gelösten Proteine; anschließend wurden sie zusätzlich mit Laminin (in DMEM), Fibronektin (in DMEM), sowie als Kontrollen mit serumhaltigem (10% FCS oder HS) und serumfreiem Medium (DMEM) inkubiert. Für die meisten Untersuchungen wurden die nicht gebundenen Proteine nach einstündiger Inkubation durch mehrmaliges Waschen mit Medium entfernt, jedoch unterschieden sich die Ergebnisse von den so vorbehandelten Platten qualitativ nur wenig von den Tests, die in Gegenwart der Attachmentfaktoren durchgeführt wurden.

1.2 Auswertung der Bindungstests

Um die Auswertung der Tests zu erleichtern, wurden die Zellen radioaktiv markiert. Es wurden sowohl angeheftete wie nicht angeheftete Zellen gezählt und der Prozentsatz an abgesetzten Zellen für jede Vertiefung, entsprechend der eingesetzten Zellzahl getrennt bestimmt.

Als radioaktive Marker wurden ^{51}Cr als Chromat oder

^{75}Se-Methionin verwendet. Die Markierung mit Chrom erfolgte während einer einstündigen Inkubation nach der Trypsinierung der Zellen. Die Selenomethionin-Inkubation wurde vor der Trypsination über Nacht durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, daß die Zellen nach dem Trypsinieren und Entfernen der nichtinkorporierten Radioaktivität direkt ausgesat werden können. Bei Verwendung von Chrom verstreichen wegen der Markierungs- und Waschdauer etwa 90 Minuten bis zum Versuchsbeginn. Dies macht eine zusätzliche Kontrolle der Spontanfreisetzung von Radioaktivität (Spontanrelease) erforderlich.

1.3 Messung der Spontanfreisetzung der in Zellen inkorporierten Radioaktivität

Um die Zellen von den Kulturschalen abzulösen und von ihren Oberflächenproteinen zu befreien, müssen sie trypsiniert werden. Durch die oft recht drastischen Bedingungen, die von Kultur zu Kultur etwas variieren, läßt es sich häufig nicht vermeiden, daß die Zellen unterschiedlich stark angegriffen werden. Dieser Schritt ist am wenigsten kontrollierbar und wohl in erster Linie für die Variationen der Ergebnisse verantwortlich. Als Folge der Membranschädigung sekretieren die Zellen einen Teil der inkorporierten Radioaktivität ins Medium und verfälschen hierdurch die erhaltenen Messung. Bei vielen Tests wurde deshalb diese Spontanfreisetzung von Radioaktivität bestimmt und, wenn nötig, die erhaltenen Meßdaten korrigiert.

Aus Abb. 18 wird ersichtlich, daß die Zellen nach ca. 90 bis 120 min einen kleinen Teil des inkorporierten Chroms verlieren. Der intrazelluläre Anteil an Selenomethionin bleibt dagegen während der gesamten Versuchsdauer konstant.

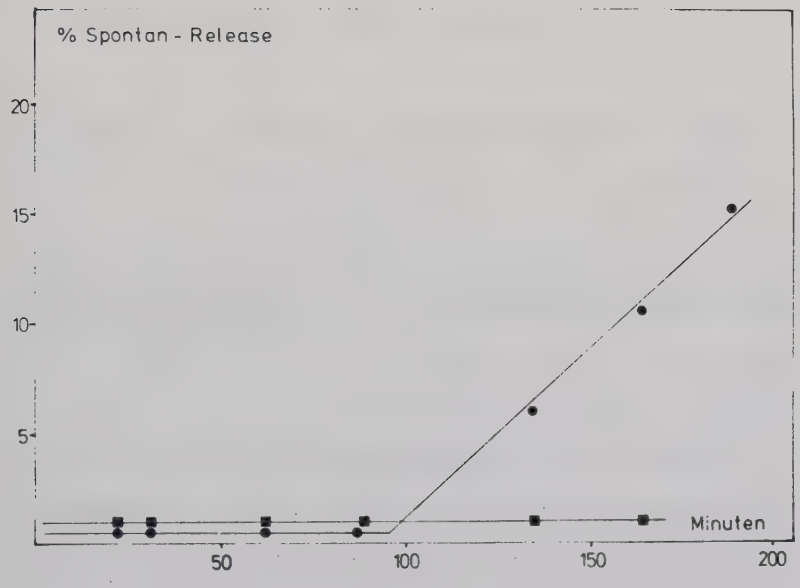


Abb.18: Messung des Spontanrelease von ^{51}Cr ● und ^{75}Se-Methionin ■ bei Mausmyoblasten.

1.4 Bindung von Kollagenen an Plastik

Bevor die verschiedenen Substrate in Attachmentversuchen getestet wurden, mußte sicher gestellt werden, daß eventuelle Unterschiede in den Attachmentassays nicht auf unterschiedlichen Beschichtungsmengen der Kollagentypen beruhten. Es wurden deshalb die Proteinmengen bestimmt, die nach Inkubation und Waschen noch auf den Microtiterplatten verblieben.

Für die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) wurden die Kollagene auf die Platten aufgetrocknet, 1 - 2 h mit PBS bei 37 ^{o}C inkubiert und anschließend 3 bzw. 12 Mal (s. Teil II, 7) mit Medium gewaschen.
Für den Radiobindungstest wurden die Kollagene mit einer kleinen Menge jodierten Proteins des gleichen Typs vor dem Antrocknen vermischt und ebenso behandelt.

Wie man der Tab. 2 entnehmen kann, binden die einzelnen Kollagentypen in annähernd gleichen Mengen an das Plastik. Am besten haften Typ I und III, am wenigsten gut das pepsinextrahierte Typ IV Kollagen. Auch bei letzterem verblieben nach 3 maligem Waschen aber noch mehr als 75 % des aufgetrockneten Proteins auf dem Plastik. Die verwendeten Kollagenmengen sind also mehr als ausreichend, um ein Absetzen der Zellen zu ermöglichen. Die Beschichtungsraten können somit für das unterschiedliche Verhalten der Zellen auf verschiedenen Substraten nicht verantwortlich sein.

Waschen	I	III	IV	V
0 x	100	100	100	100
3 x	76[1,2]	78[1]	89[1,2]	79[2]
12 x	74[1,2]	75[1]	62[1,2]	66[2]

Tab. 2: Bindung von verschiedenen Kollagenen an Microtiterplatten. Die %-Werte der gebundenen Proteine wurden teilweise durch Proteinbestimmung nach Lowry (1) oder durch Radiobindungstests (2) bestimmt.

2. Attachment von L6-Zellen

Zunächst wurden Absetzrate und Absetzgeschwindigkeit von L6-Muskelzellen auf verschiedenen Kollagentypen untersucht. Das Attachment der Muskelzellen ist auf Kollagenen von dessem Typ abhängig. Besonders rasch setzen sie sich auf Typ IV Kollagen ab. Auf diesem Substrat werden auch die höchsten Absetzraten beobachtet (Abb. 19). Auf den interstitiellen Kollagenen I, III und V verläuft das Attachment wesentlich langsamer. Auch nach längerer Inkubationsdauer haften die Zellen auf diesen Substraten wesentlich schlechter an, als auf Typ IV Kollagen (Abb. 19).

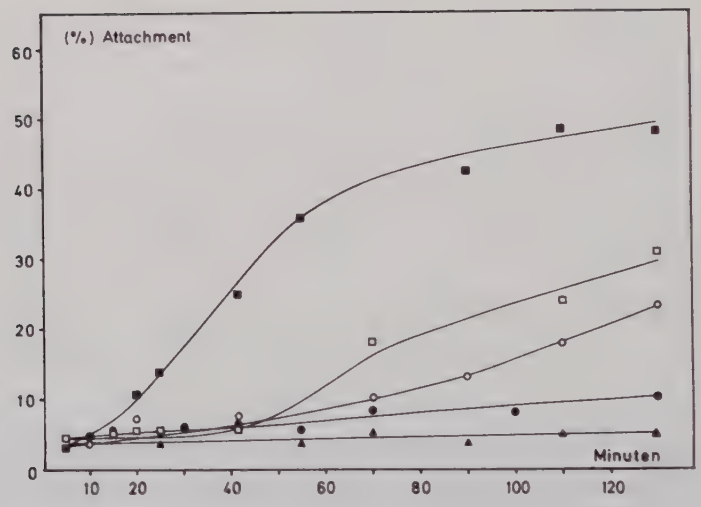


Abb.19: Attachment von L6-Myoblasten auf verschiedenen Substraten. ○ Typ I, □ Typ III, ■ Typ IV, ● Typ V, ▲ Laminin, BSA und Plastik.

Auch Fibronektin fördert das Absetzen der Myoblasten. Für dieses Protein spielt es keine Rolle ob es an Kollagen gebunden oder auf Plastik aufgetrocknet wurde (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu findet an Laminin allein keine Bindung der Zellen statt. Muskelzellen unterscheiden sich in dieser Hinsicht von vielen anderen Zelltypen wie z.B. Epithelzellen.

Alle Bindungstests wurden in serumfreiem Medium durchgeführt, um Effekte durch Serumfaktoren auszuschließen. Trotzdem bestand die Möglichkeit, daß Muskelzellen Attachmentfaktoren selbst produzieren und auf ihrer Oberfläche deponieren. Vor allem durch neusynthetisiertes Fibronektin und Laminin würde die Auswertung der Bindungstests erschwert. Wegen der relativ drastischen Bedingungen während der Trypsinierung der Zellen, durch die die oberflächengebundenen Proteine möglichst vollständig entfernt werden sollten, hatten wir darauf verzichtet, die Proteinsynthese, und damit die Regeneration der Zelloberfläche durch Zusatz von Cycloheximid zu blockieren. Es wurde deshalb der Versuch unternommen, das eventuell noch vorhandene zellgebundene Fibronektin bzw. Laminin durch Zugabe von Antikörpern während der Erholungsphase der Zellen zu neutralisieren.

Attachmentassays mit derart vorbehandelten Zellen zeigten, daß die Antikörperzugabe das Anheften der Myoblasten an die Kollagene allein kaum beeinflußt. Die unterschiedliche Affinität der Muskelzellen zu den verschiedenen Kollagentypen ist also zumindest von diesen beiden Attachmentproteinen unabhängig.
In Gegenwart von anti-Fibronektin und anti-Laminin haften die Zellen wiederum am besten auf Typ IV, weniger gut auf Typ I, III und V Kollagen (Abb. 20). Bei Verwendung des Antikörpers gegen Laminin sind die Werte im Vergleich mit reinem Kollagen jedoch um ca. 10 % erhöht, während sie mit anti-Fibronektin unverändert bleiben (Abb. 20; s.a. 5.).

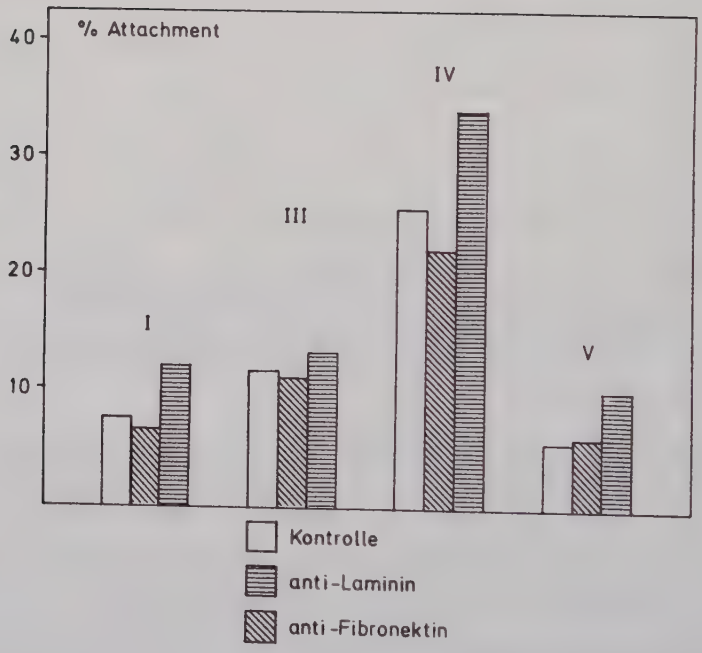


Abb.20: Attachment von L6-Myoblasten auf verschiedenen Kollagentypen in Gegenwart von Antikörpern gegen Laminin und Fibronektin.

3. Einfluß von Fibronektin und Laminin auf das Attachment von L6-Zellen an Kollagen

Der Zusatz von Fibronektin beschleunigt das Absetzen der L6-Zellen auf allen Kollagentypen, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Auf Typ I setzen sich die Zellen vermehrt ab (Abb. 21). Das gleiche gilt für Typ III und V Kollagen (nicht gezeigt). Auf Typ IV, das von sich aus schon einen ausgeprägten attachmentfördernden Effekt besitzt, ist ein zusätzlicher Effekt durch das Fibronektin kaum erkennbar. Zumindest in der Anfangsphase sind die Absetzraten der Zellen nicht erhöht (Abb. 21).

Auch Laminin erhöht die Absetzrate der L6-Myoblasten auf Kollagensubstraten. Im Gegensatz zum Fibronektin wirkt es bevorzugt auf Typ IV Kollagen-Substraten (Abb. 22). Das Attachment auf Typ I und V Kollagen bzw. auf BSA wurde durch Laminin nicht gefördert (nicht gezeigt). An Typ III haften die Zellen in Gegenwart von Laminin oftmals besser, als an den anderen interstitiellen Kollagenen, doch werden selten ähnlich gute Werte wie beim Typ IV erreicht (nicht gezeigt).

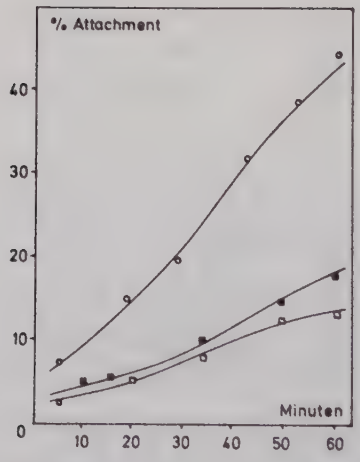


Abb. 21

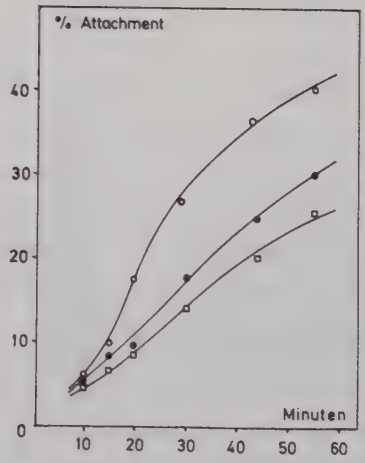


Abb. 22

Abb.21 und 22: Attachment von L6-Myoblasten auf Kollagen in Gegenwart von Fibronektin und Laminin.
Abb.21: Attachment auf Typ I Kollagen □ bei Anwesenheit von Fibronektin ○ , Laminin ■ .
Abb.22: Attachment auf Typ IV Kollagen □ bei Anwesenheit von Fibronektin ● und Laminin ○ .

4. Inhibition des Attachments mit Antikörpern

Um die Spezifität des Lamininеffekts zu testen, wurde versucht, die Stimulation der Bindung an Typ IV durch Laminin durch Zugabe von Antikörpern gegen Laminin zu neutralisieren. Hierzu wurden die Substrate vor der Zellzugabe zunächst mit Antiseren gegen Laminin, oder als Kontrolle, mit Antikörpern gegen Fibronektin inkubiert. Für das Ergebnis des Versuchs spielte es keine Rolle, ob die ungebundenen Antikörper durch Waschen vor der Zellzugabe entfernt wurden, oder während der gesamten Versuchsdauer im Medium verblieben.

Werden die Kollagen/Laminin-Substrate mit einem Antiserum gegen Laminin inkubiert, haften auf Typ III und IV Kollagen erheblich weniger Zellen an (Abb. 23,a). Die wenigen Zellen, die sich auch bei Anwesenheit von Laminin auf Typ I und V Kollagen absetzen, werden durch den Antikörper kaum beeinflußt (vergl. Abb. 23, a,b). Dies deutet erneut darauf hin, daß Laminin bei der Adhäsion an Typ I und V Kollagen keine Rolle spielt, und das Absetzen der Zellen über einen anderen Adhäsionsmechanismus, wahrscheinlich über Fibronektin, verläuft.

Eine vollständige Blockierung des Zellattachments durch das Antiserum gelang nicht. Das liegt wahrscheinlich daran, daß das Antiserum im Gegensatz zu affinitätsgereinigten Antikörpern noch einen hohen Serumproteingehalt besitzt, der

für die geringe Eigenaktivität dieses Serums verantwortlich ist. So könnten z.B. geringe Mengen an Fibronektin den Zellen ein Absetzen ermöglichen.

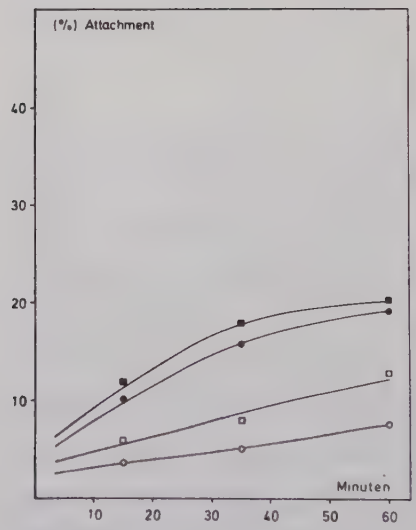


Abb. 23a

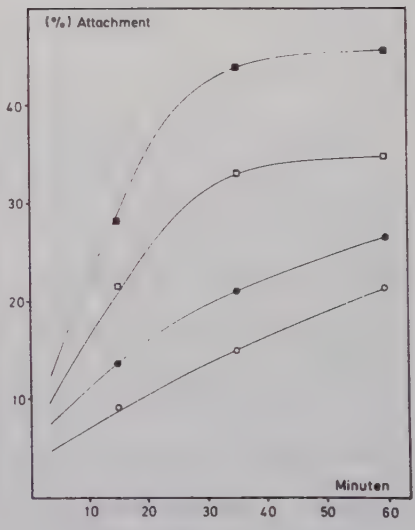


Abb. 23b

Abb.23a,b: Inhibition des Attachments von L6-Zellen auf Kollagen-Laminin Substraten. Die Substrate wurden vor der Zellzugabe mit Antikörpern gegen Laminin inkubiert. (b) Kontrolle ohne Antikörperzugabe, (a) Attachment in Gegenwart von anti-Lamininserum auf Typ I ● , III □ , IV ■ und V ○ Kollagen.

5. Korrektur der Inhibitionswerte mit anti-Laminin Seren

Die in Abschnitt 4 erhaltenen Daten hatten gezeigt, daß die im Inhibitionstest verwendete IgG-Fraktion des anti-Lamininserums selbst das Anheften der Zellen auf Kollagen fördert. Die Werte der Abb. 23 wurden deshalb bezüglich dieser Eigenaktivität des Serums korrigiert. Es wurde für jedes Substrat der Differenzbetrag der Werte auf reinem Kollagen in Gegenwart des Antikörpers und Kollagen bzw. Kollagen/anti-Fibronektin gebildet und von den Daten der Abb. 23 subtrahiert (Abb. 24). Durch diese Korrektur wird deutlich, daß das Attachment auf den Substraten III und IV (inkubiert mit Laminin) durch den Antikörper gegen Laminin fast vollständig inhibiert wird. Auf Typ I ist die Inhibition weniger ausgeprägt (Abb. 24).

Eine Inhibition des Attachments auf Fibronektin wurde nicht durchgeführt. Fast 100% der Zellen setzten sich in Gegenwart von Antikörpern gegen Fibronektin innerhalb kürzester Zeit ab. Grund hierfür waren die geringen Restmengen an oberflächengebundenem Fibronektin, das entweder durch die Enzymbehandlung nicht vollständig entfernt, oder von den Zellen wieder neu synthetisiert wurde. Sie werden durch den Antikörper mit dem Fibronektin-substrat quervernetzt und beschleunigen hierdurch das Absetzen der Zellen.

Diese Schwierigkeiten lassen sich durch Verwendung der nicht quervernetzenden F_{ab}-Fragmente des Antikörpers umgehen. Derartige Versuche sind in Vorbereitung.

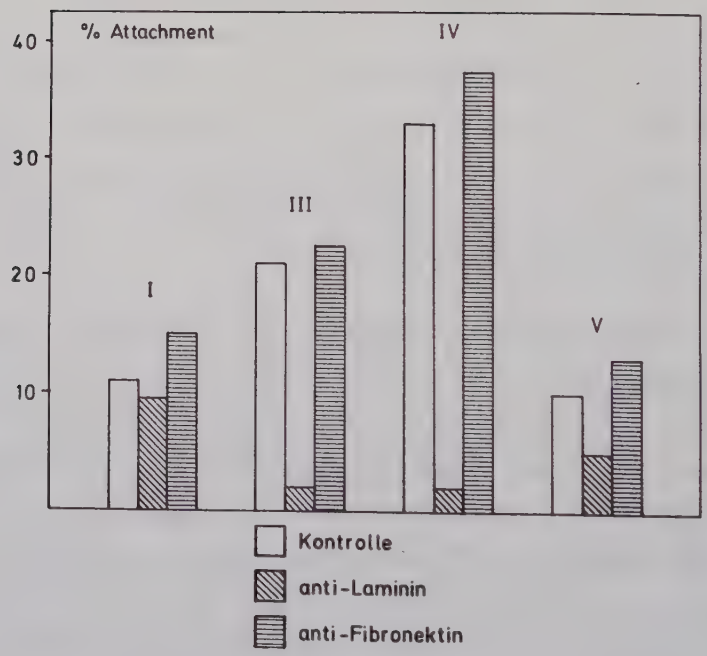


Abb.24: Inhibition des Attachments von L6-Myoblasten nach 60 min auf Kollagen/Lamininsubstraten mit Laminin Antikörpern (korrigierte Werte, s. Text).

6. Attachment von primären Myoblasten

Die beschriebenen Ergebnisse mit der L6-Muskelzellinie können nicht ohne weiteres auf primäre Muskelzellen übertragen werden. Für viele transformierte Zellen wurde z.B. gezeigt, daß sie membrangebundenes Fibronektin verlieren (Hynes, 1976). Neben dem Veränderung der Zellmorphologie (Yamada, 1978) kommt es auch zu einer Verminderung der Zelladhäsion gegenüber normalen Zellen.

Die in Teil I, Kap. 2 dargestellte Reinigung von Wachtel- und Mausmyoblasten ist mit relativ hohen Zellverlusten verbunden, wenn man fibroblastenfreie Kulturen anstrebt. Deshalb wurden mit hochgereinigten Primärzellen Attachmentassays nur auf einigen ausgewählten Substraten durchgeführt.

Wie schon bei den L6-Zellen ist der Laminin/Typ IV-Komplex das bevorzugte Substrat für Muskelzellen. Die Geschwindigkeit des Attachments sowie der erreichte Anteil an abgesetzten Zellen sind gegenüber der Zellinie deutlich erhöht (Abb. 25). Bereits nach 10 min haben sich annähernd 70% der Muskelzellen abgesetzt.

Auch bei den primären Mausmyoblasten wird die Rate der auf Kollagen/Laminin Substraten angehafteten Zellen durch Zugabe eines anti-Laminin Serums reduziert (Abb. 26). Eine vollständige Inhibition wird aber wiederum nicht erreicht (s. Kap. 4).

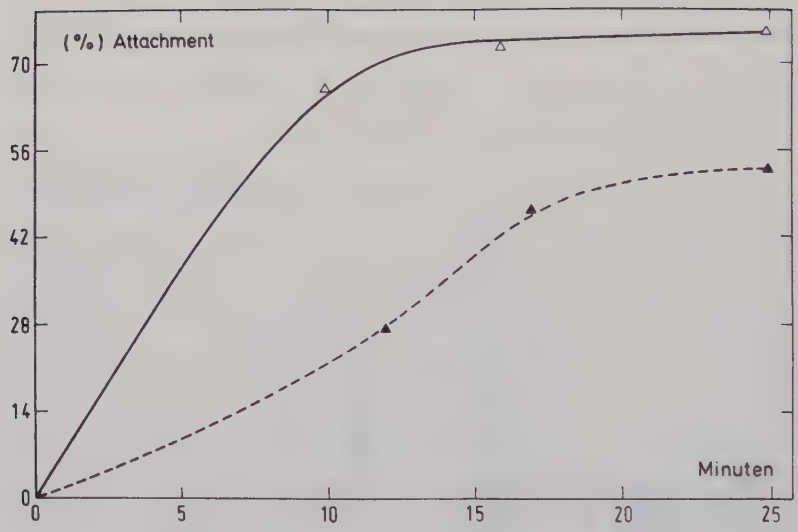


Abb.25: Attachment von primären Mausmyoblasten auf Typ VI Kollagen ohne ▲ und in Gegenwart von Laminin △ .

Auf Typ I/Laminin und I/Fibronektin wurden nach ca. 20 bis 25 min konstante Werte erhalten, die je nach Experiment zwischen 40 und 60 % lagen (nicht gezeigt). Die Werte der Kombination IV/Fibronektin lagen in einem ähnlichen Bereich, wenn auch meist geringfügig niedriger.

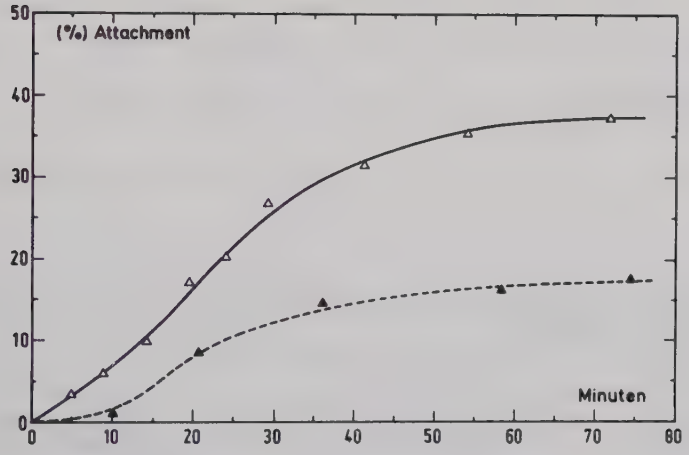


Abb.26: Inhibition des Attachments von primären Mausmyoblasten auf Typ IV Kollagen/Laminin mit anti-Laminin Antikörpern ▲ . △ Kontolle ohne Antikörper.

In einem Parallelversuch wurden, in abgeänderter Weise, nicht die Kollagensubstrate, sondern die Zellen mit Laminin und Fibronektin vorinkubiert und nach zweimaligem Waschen auf Kollagen ausgesät.

Die Menge der abgesetzten Zellen ist hierbei deutlich verringert (Abb. 27). Auch auf dem besten Substrat, wiederum dem Typ IV Kollagen, wurden nur Werte um 20% erreicht. Der Unterschied zu den übrigen Kombinationen ist dennoch stärker ausgeprägt als im zuvor beschriebenen Versuch. Die Kombinationsfolge IV/Lam > I/FN > I/Lam > IV/FN bleibt dabei erhalten.

Auf Typ I Kollagen beginnen die mit Laminin inkubierten Zellen erst nach 15 min anzuheften. Eine ähnliche Latenzphase wurde auch bei den L6-Zellen beobachtet.

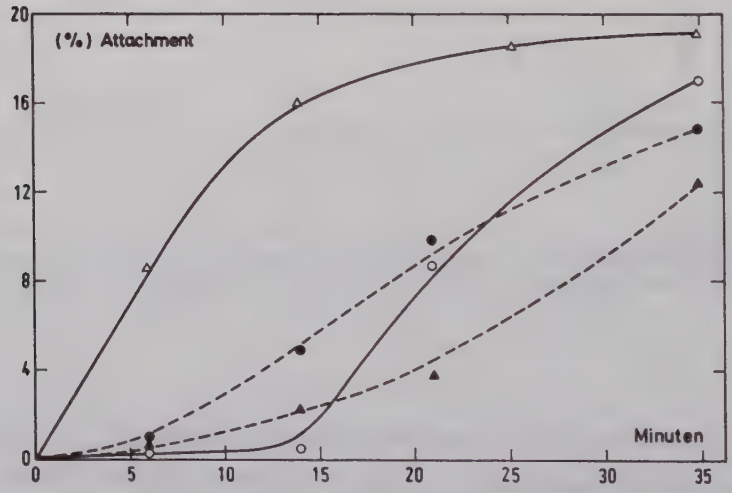


Abb.27: Attachment von primären Mausmyoblasten auf Typ I ○,● und IV △,▲ Kollagen nach Inkubation der Zellen mit Laminin ○,△ und Fibronektin ●,▲.

7. Vergleich der Attachmentdaten unter verschiedenen Testbedingungen

Für eine optimale Zell-Matrix Wechselwirkung müssen bestimmte Bedingungen erfüllt sein. Aus Untersuchungen über das durch Fibronektin induzierte Attachment weiß man, daß es keineswegs gleichgültig ist, ob das Attachmentprotein zuerst an die Zelle oder an das Kollagen bindet (Hynes und Yamada, 1982). Abb. 28,b zeigt, daß die Inkubation der Zellen mit Laminin zu einer Verlangsamung der Absetzraten und der insgesamt abgesetzten Zellzahl führt, ohne die Spezifität der Bindung zu beeinflussen (s.a. Abb. 27). Auch unter diesen Bedingungen bleibt das Typ IV Kollagen das bevorzugte Substrat für Muskelzellen. Wird der Test in kontinuierlicher Gegenwart des Attachmentfaktors durchgeführt, können sich erheblich mehr Zellen absetzen, als auf dem mit Laminin vorinkubierten Substraten (Abb. 28,a).

Dies kann einerseits darauf beruhen, daß durch die längere Inkubationszeit mehr Laminin an das Kollagen bindet und hierdurch mehr Bindungsstellen für die Zellen zur Verfügung stehen (s. 9.1.1). Da aber auch Muskelzellen Laminin binden (s. 9.1.2) sind zusätzliche Interaktionen zwischen substratgebundenem und zellgebundenem Laminin denkbar, woraus ebenfalls höhere Attachmentraten resultieren würden. Ein ähnlicher Effekt ist auch beim Anhaften von Myoblasten über Fibronektin beobachtet worden (Chiquet et al., 1980).

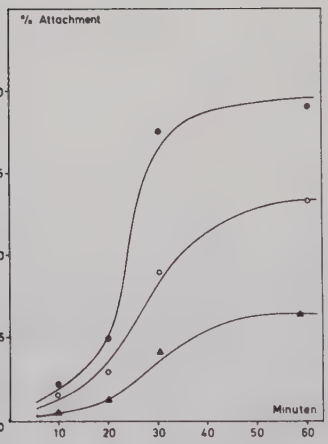


Abb. 28a

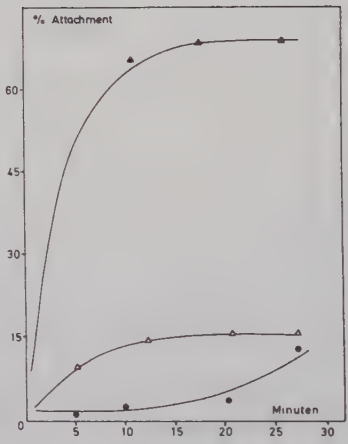


Abb. 28b

Abb.28a,b: Attachment von primären Myoblasten unter verschiedenen Testbedingungen auf Typ IV Kollagen.

Abb.28a: Attachment von Wachtelmyoblasten nach Vorinkubation des Substrats O , bzw. kontinierlicher Anwesenheit ● von Laminin. ▲ Kontrolle ohne Laminin.

Abb.28b: Attachment von Mausmyoblasten nach Vorinkubation der Zellen Δ , bzw. des Substrats ▲ mit Laminin; ● Kontrolle ohne Laminin.

8. Vergleich der Adhäsion von Muskelzellen und Fibroblasten an Kollagen/Laminin und Kollagen/Fibronektin Substrate

Auch Fibroblasten benutzen Fibronektin, wenn sie sich an eine kollagenhaltige Matrix anheften (Klebe, 1974). Nach Couchman sind sie aber auch in der Lage, an Laminin direkt zu binden (Couchman et al., 1983). Dieser letzte Befund stimmt nicht mit den von uns gemachten Beobachtungen überein, jedoch muß man bei einem Vergleich der Daten berücksichtigen, daß Muskelfibroblasten sich eventuell anders verhalten, als Fibroblasten anderer Herkunft.

Um die Affinität von Myoblasten und Fibroblasten zu Kollagenen, Laminin und Fibronektin zu vergleichen, wurde eine noch nicht vorgereinigte Primärmuskelzellsuspension aus verwendet. In Gegenwart von Laminin setzten sich Myoblasten schneller auf Typ III und IV ab, als Muskelfibroblasten. Während der ersten 25 bis 30 min werden praktisch nur Myoblasten auf diesen Substraten angereichert. Dies wurde festgestellt, indem die nach 30 min nicht angehafteten Zellen abdekantiert, und die angehafteten Zellen mehrere Tage kultiviert wurden, bis anhand der Morphologie zwischen Fibroblasten und Myoblastenunterschieden werden konnte (Abb. 29,d).

Auf Typ I und V Kollagen findet ein derartiger Selektionsprozeß nicht statt, ebensowenig wie auf irgend einem der Kollagentypen in Gegenwart von Fibronektin. Unterschied-

liche Anhaftgeschwindigkeiten zwischen beiden Zelltypen sind in diesen Fällen nicht erkennbar (Abb. 29,a-c).

Der in Abb. 29 gezeigte Effekt des selektiven Attachments ist möglicherweise von zentraler Bedeutung für die Selektion von Myoblasten aus einem Fibroblasten/Myoblastengemisch und den Fusionsprozeß (s. Diskussion). Er bietet eine praktische Möglichkeit, Myoblasten in einem Adhäsionsschritt von den Fibroblasten abzutrennen. Dennoch war es bisher aus technischen Gründen nicht möglich, diese Methode zur Anreicherung von Myoblasten in großem Maßstab einzusetzen.

Abb.29: Attachment von Mausmyoblasten und Mausfibroblasten auf verschiedenen Substraten: (a-d) Abtrennung von Myoblasten und Fibroblasten auf unterschiedlichen Kollagensubstraten in Gegenwart von Laminin und Fibronektin. Petrischalen wurden mit Kollagenen beschichtet, 60 min mit Laminin oder Fibronektin inkubiert und drei mal mit DMEM gewaschen. Anschließend wurde eine frisch isolierte Mausmuskelzellsuspension ausplatiert und 20 min auf den Schalen belassen. Die nicht gebundenen Zellen wurden abgesaugt und die angehafteten 4-5 Tage mit normalem Kulturmedium weiterkultiviert, bis bei den myogenen Zellen Fusion eintrat.
(a) Typ I/Fibronektin, (b) Typ IV/Fibronektin, (c) Typ I/Laminin, (d) Typ IV/Laminin.

(e-h) Einfluß der Matrixproteine auf die Fusion von Muskelzellen. Gereinigte Mausmyoblasten wurden auf verschiedenen Substraten ausplatiert, mit DMEM, 15 % HS und 1 % EE kultiviert und nach 48 h photographiert.
(e) Typ I/Fibronektin, (f) Typ IV/Fibronektin, (g) Typ I/Laminin, (h) Typ IV/Laminin. Vergr. x150

a
b
c
d
e
f
g
h

9. Wechselwirkungen des Laminins mit Kollagenen und Muskelzellen

Ungeklärt ist noch der Befund, daß Laminin zwar die Bindungsrate von Myoblasten an Typ IV Kollagen erhöht, daß aber reines Laminin von den Zellen nicht als Substrat genutzt werden kann. Als Erklärung kann eine durch Typ IV Kollagen bedingte Konformationsänderung dienen, oder eine 3-Komponenten Interaktion zwischen Laminin, Typ IV Kollagen und der Zelloberfläche. Auch dem selektiven Effekt des Laminins im Attachmentassay und den Unterschieden im Vergleich zwischen Myoblasten und den Fibroblasten (s. Kap. 8) können verschiedene Ursachen zugrunde liegen.

So könnten beide Zelltypen z.B. über eine unterschiedliche Anzahl von Bindungsstellen für dieses Protein verfügen. Auch verschiedene Bindungskonstanten derartiger Matrixrezeptoren würden die beschriebenen Ergebnisse erklären. Unabhängig von den Zelleigenschaften ist es darüberhinaus denkbar, daß von den einzelnen Kollagentypen unterschiedliche Mengen Laminin gebunden werden. In diesem Fall könnte das an Typ IV gebundene Protein gerade noch ausreichend sein, um den Muskelzellen ein Anhaften zu gestatten, während es den Fibroblasten das Absetzen nicht mehr ermöglicht. Auch die erhöhten Absetzraten der Myoblasten auf Typ IV Kollagen würden hierdurch erklärt.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden eine Reihe von

Bindungstests von Laminin an Kollagen bzw. an Zellmembranen durchgeführt.

9.1 Bindung von Laminin an Kollagen

Fibronektin bindet gut an natives Typ III, weniger gut an Typ I, IV und V Kollagen (Dessau et al., 1978a; Jilek und Hörmann, 1978). Über die Affinität von Laminin zu Kollagen gibt es jedoch wiedersprüchliche Ergebnisse (s. Diskussion). Um diese Frage unter den Bedingungen der Attachmentstudien abschätzen zu können, wurden Radiobindungstests und ELISA's durchgeführt.

9.1.1 Radiobindungstests

Microtiterplatten wurden mit gleichen Mengen an Kollagentypen I, III, IV und V beschichtet. Die beschichteten Platten wurden mit ^{125}J-markiertem Laminin 60 bis 90 min inkubiert, anschließend gewaschen und die gebundene sowie ungebundene Radioaktivität im γ-Counter bestimmt.

Während der kurzzeitigen Inkubation banden maximal 1,5 % des Laminins, wobei die einzelnen Kollagentypen kaum signifikante Unterschiede zeigten (Tab. 3). Bei längerer Inkubationsdauer (12 h) sind die Werte auf Typ III und IV Kollagen erhöht (Tab. 3).

	I_H	I_R	III_H	III_R	IV_M	V_H	BSA
Min							
60	0.55	0.44	0.70	0.31	0.96	1.09	0.36
90	0.62	0.50	1.32	0.61	1.32	1.42	0.42
12 h	3.20	3.20	5.20	5.10	5.90	3.60	3.00

Tab. 3: Bindung von ^{125}J-Laminin an verschiedene Kollagene. Die Kollagene vom Huhn (H), der Ratte (R) oder der Maus (M) wurden auf Microtiterplatten aufgetrocknet, die angegebenen Zeiten mit Laminin inkubiert. Die angegebenen Werte geben die gebundene Radioaktivität in % der aufgetragenen Radioaktivität nach mehrmaligem Waschen an.

9.1.2 ELISA

Für den ELISA wurden die kollagenbeschichteten Microtiterplatten 60 min mit Laminin vorbehandelt, gewaschen und anschließend mit Antikörpern gegen Laminin in absteigender Verdünnung versetzt. Der Nachweis der gebundenen Menge an Antikörper erfolgte mit Hilfe eines peroxidasegekoppelten zweiten Antikörpers. Bei dieser Messung ist allerdings zu berücksichtigen, daß dieser Test insgesamt 12 Waschschritte enthält, und hierdurch mehr Typ IV- und V-, als Typ I Kollagen von den Platten heruntergewaschen werden (s. 1.4 Tab. 2, 12x waschen).

Tabelle 4 zeigt diejenigen Verdünnungen, in denen im ELISA noch eine positive Reaktion erkennbar war. Demzufolge bindet IV Kollagen mehr Laminin, als Typ I und V. Die besten Bindungseigenschaften für Laminin weist jedoch das aus 4 Typ IV Molekülfragmenten bestehende 7S-Kollagen auf. Auf diesem Substrat werden bei Wachtelmyoblasten in Gegenwart von Laminin auch die besten Bindungskurven im Attachment-assay gefunden (Daten nicht gezeigt).

Substrat	I	III	V	IV	7S	BSA
Verd.	1:100	1:30	1:30	1:100	1:6250	1:30

Tab. 4: Bindung von Laminin an verschiedene Kollagentypen: Kollagensubstrate wurden mit Laminin inkubiert, und das gebundene Laminin mit Hilfe einer Antikörperverdünnungsreihe nachgewiesen. Gezeigt sind diejenigen Verdünnungen, in denen im ELISA noch eine positive Reaktion nachweisbar war.

9.2 Bindung von Laminin an Zellen

Um zu testen, ob Unterschiede in der Lamininbindungsfähigkeit zwischen Myoblasten und Fibroblasten bestehen, wurden gleiche Mengen beider Zellarten bei 37 °C mit ^{125}J-markiertem Laminin unter Schütteln inkubiert und anschließend durch Zentrifugation gewaschen. Zusätzlich wurden auch isolierte Zellmembranen von Myoblasten und Fibroblasten auf Microtiterplatten aufgetrocknet und die Lamininbindung im Radioassay ermittelt.

	Fib.	Myobl.	Fib.-Membr.	Myobl.-Membr.
Min				
30	5.2	11.5	1.1	3.7
90	5.8	11.9	2.0	6.6
210	7.8	12.5	-	-

Tab. 5: Bindung von ^{125}J-Laminin an Zellen und isolierte Membranen. Angegeben sind die %-Bindungswerte von Laminin an Zellen in Suspension und an auf Microtiterplatten aufgetrockneten Membranen.

Innerhalb der ersten 90 min banden Muskelzellen etwa doppelt soviel Laminin wie die Fibroblasten (Tab. 5). Auch die Muskelzellmembranen wiesen eine vermehrte Lamininbindung auf. Bezogen auf die gleiche Proteinmenge vermochten Muskelmembranen 3 mal mehr Laminin zu binden, als die der Fibroblasten (Tab. 5).

10. Einfluß von Kollagen, Laminin und Fibronektin auf die Fusion von Myoblasten

Über den Einfluß von Kollagen auf die Muskeldifferenzierung war bereits hingewiesen worden. Welche Effekte von anderen Matrixkomponenten wie Fibronektin oder Laminin ausgehen, ist nicht eindeutig geklärt. Es liegen eine Reihe von Beobachtungen vor, die sich zum Teil aber widersprechen.

So berichteten Podleski et al. (1979) über eine Inhibition oder zumindest eine Verzögerung der Fusion von L6-Zellen durch Fibronektin. Dagegen kamen Chen und Mitarbeiter (1977) zu einem entgegengesetzten Ergebnis. Sie fanden eine Stimulation der Myotubenbildung bei L8-Zellen auf einer Fibronektinmatrix.

Vermehrte Fusionraten treten bei Muskelzellen auch auf, wenn die Zellen zu einem Zeitpunkt, der kurz vor der spontan einsetzenden Fusion liegt, trypsiniert werden. Dies wurde dem enzymatischen Abbau des oberflächengebundenen Fibronektins zugeschrieben (Podleski et al., 1979). Der

gleiche Effekt wurde auch durch Zugabe von Antikörpern gegen Fibronektin erzielt.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit meinen Beobachtungen an differenzierenden Muskelzellen: kurz vor Beginn der Fusion findet man in den Kulturen eine Umlagerung bzw. einen Abbau der Fibronektinmatrix (s. Teil I, Kap. 6, Abb. 8; Chen, 1977).

Die Bevorzugung gewisser Kollagene und Kollagen/Laminin- oder Kollagen/Fibronektin- Komplexe während des Attachments der Muskelzellen wirft nun die Frage auf, ob diesen Komponenten der ECM auch bei der Steuerung der Zelldifferenzierung eine Rolle zukommt. Speziell für Myoblasten sollte also geklärt werden, ob eines dieser Proteine die Fusion zu Myotuben beeinflußt.

Gereinigte Mausmyoblasten wurden auf verschiedenen Kollagenen mit und ohne Fibronektin bzw. Laminin ausgesät. Einige Tage später wurden die Fusionsraten der Kulturen bestimmt.

Auf einer Substratkombination aus den Basalmembranproteinen Typ IV Kollagen und Laminin beginnen die Zellen 12-24 h früher zu fusionieren als auf den Kontrollplatten (Abb. 29,e), die mit Typ I oder IV Kollagen beschichtet, aber nicht zusätzlich mit Laminin vorinkubiert worden waren. Nach 4-5 Tagen findet man mehr als 90 % der Kerne in den Myotuben (Abb. 29,h). Im Gegensatz hierzu ist die Fusionsrate der Zellen in Gegenwart von Fibronektin stark

reduziert. Auch nach 7 Tagen besteht die Zellkultur auf Typ I, III, IV und V Kollagen überwiegend aus einkernigen Zellen (Abb. 29,f). Der Effekt des Laminins ist also nur in Verbindung mit Typ IV Kollagen zu beobachten, auf den interstitiellen Kollagenen unterscheiden sich die Kulturen nicht von den Kontrollen, auf denen die Fusionsrate etwa bei 60 % liegt (Abb. 29,g).

11. Zell-Zell-Wechselwirkungen

Für die Fusion von Zellen ist ein direkter Zell-Zell-Kontakt notwendig. Neben der Fähigkeit zur Fusion müssen die Zellen auch über einen Mechanismus der spezifischen Zellerkennung verfügen.

Kommt es zu einem Kontakt eines postmitotischen, fusionsfähigen Myoblasten mit einer einer anderen Zelle, die noch nicht fusionsbereit ist (z.B. mitotischer Myoblast) oder einem anderen Zelltyp angehört, entfernt sie sich wieder von dieser. Desgleichen wandert diese Muskelzelle weiter, wenn sie auf einen Myotuben trifft, der bereits eine große Anzahl von Kernen enthält, und sich, vermutlich aufgrund veränderter Oberflächenstruktur, als nicht mehr fusionsbereit zu erkennen gibt.

Es liegt nahe, diese Information in der Zellmembran lokalisiert zu vermuten. Wenn also eine Muskelzelle mit z.B. einem Fibroblasten nicht fusioniert, kann es zum einem daran liegen, daß der Fibroblast hierzu nicht befähigt ist. Zum

anderen ist es aber auch denkbar, daß der Fusionsprozeß wegen der fehlenden Zellerkennung und/oder der verminderten Zelladhäsion zwischen diesen beiden Zellen nicht erfolgen kann.

Um festzustellen, ob überhaupt eine größere Affinität zwischen Muskelzellen untereinander besteht, als zwischen Muskelzelle und Fibroblast, wurden wiederum Bindungstests durchgeführt. Microtiterplatten wurden mit isolierten Membranen beider Zelltypen beschichtet. Attachmentassays auf isolierten Myoblasten- und Fibroblastenmembranen analog denen mit Matrixproteinen sollten dann Aufschluß darüber geben, ob sich die Myoblasten auf ihren eigenen Membranen besser absetzen, was einer bevorzugten Myoblast-Myoblast-Wechselwirkung entspräche. Auch über den Einfluß membranständiger Proteine, wie dem Laminin, könnte ein derartiger Test Aufschluß geben.

Die Membranen wurden wie in Teil III, Kap. 1 beschrieben isoliert und entsprechend den Kollagensubstraten auf die Platten aufgetrocknet.

Wie erwartet, haften die Muskelzellen gut an homologen Membranen (Abb. 30). Die Bindung ist etwas stärker ausgeprägt, als auf Typ IV Kollagen. Auf Fibroblastenmembranen vermögen sich die Zellen dagegen ebensowenig abzusetzen, wie auf Typ I Kollagen (Abb. 30).

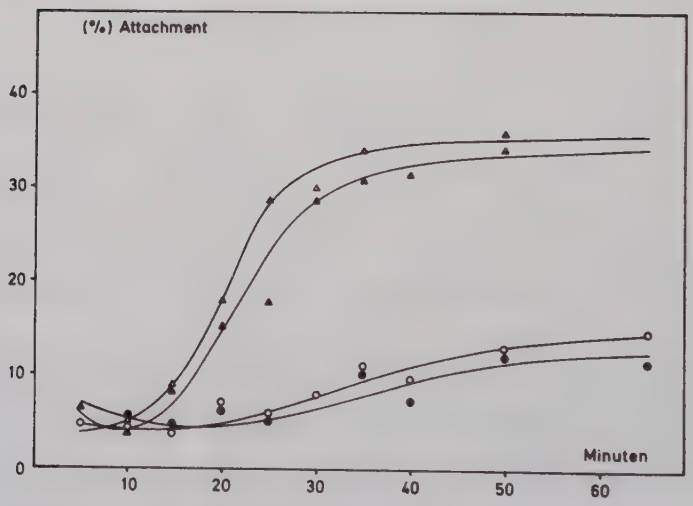


Abb.30: Attachment von L6-Zellen auf isolierten Zellmembranen von Myoblasten Δ und Fibroblasten O : ● Typ I, ▲ Typ IV Kollagen.

Inkubiert man die Membranen mit Laminin, setzen sich die Muskelzellen auf Muskelmembranen weder rascher ab, noch ist

die insgesamt abgesetzte Zellzahl wesentlich erhöht (Abb. 31). Dies ist auch nicht zu erwarten, denn wie in Abb. 19 gezeigt worden war, vermögen die Muskelzellen sich nicht direkt an Lamininsubstraten anzuheften. Die Wirkung des Laminins besteht nur bei Anwesenheit von Typ IV Kollagen und dieses geht während der Membranpräparation mit anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix verloren (s. Teil III, Kap. 1).

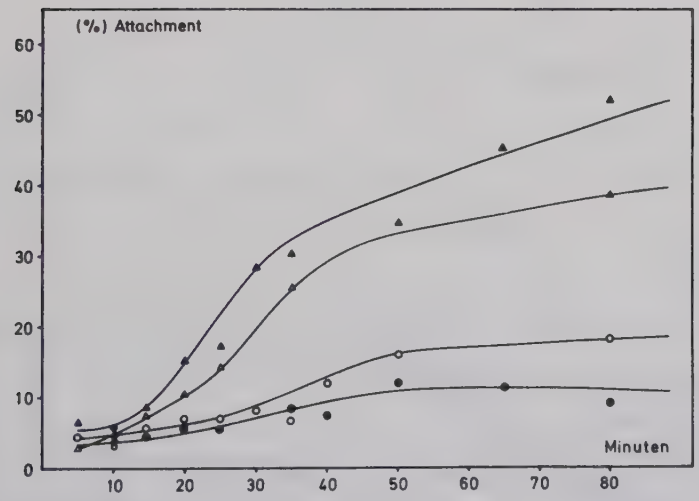


Abb.31: Effekt von Laminin auf das Absetzen von L6-Zellen auf isolierten Zellmembranen. Membranen von Myoblasten mit ▲ und ohne △ Laminin; Membranen von Fibroblasten mit ○ und ohne ● Laminin.

Für die direkte Zell-Zell- Wechselwirkung ist Laminin also offensichtlich nicht notwendig. Es spielt demnach vor allem bei Zellerkennungs- und Zelladhäsionsphänomenen eine Rolle und weniger während des eigentlichen Fusionsprozesses.

An Fibroblastenmembranen findet bei Anwesenheit von Laminin keine (Abb. 31), bei Anwesenheit von Fibronektin oder Serum eine geringe Bindung der Myoblasten statt (Abb. 32). Auf Muskelzellmembranen führt Serum dagegen zu einer sehr starken Erhöhung und Beschleunigung des Attachments (Abb. 32).

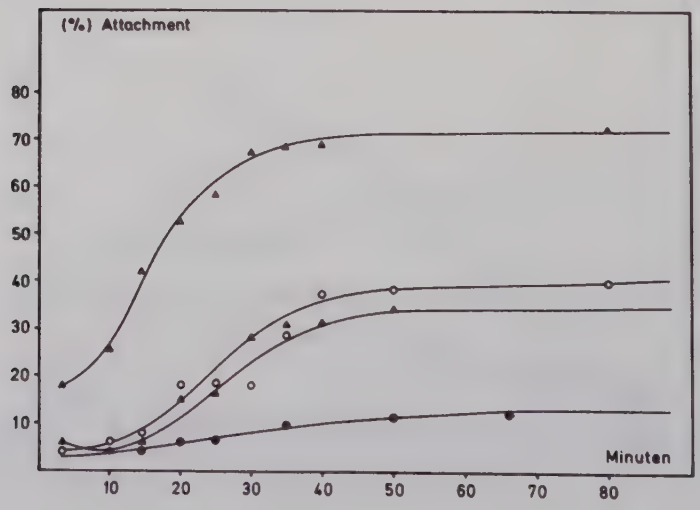


Abb.32: Effekt von Serum oder Fibronektin auf das Absetzen von L6-Zellen auf Myoblasten- Δ und Fibroblastenmembranen O . ▲ , ● Kontrollen ohne Serum.

Teil III: Isolierung eines Laminin-bindenden Proteins aus Muskelzellmembranen

EINLEITUNG

Die Ergebnisse der vorangegangenen Kapitel hatten die Fähigkeit der Muskelzellen zur Synthese der Matrixproteine und deren Einbau in die ECM gezeigt. Das Endomysium besteht vorwiegend aus Typ I, III und V Kollagen sowie Fibronektin, an das sich die proliferativen Myoblasten und die Fibroblasten anheften. Zum Zeitpunkt der Fusion, wenn die Zellen bereits im postmitotischen Zustand vorliegen, verlieren sie den Kontakt mit dieser Matrix und zeigen eine erhöhte Affinität zu den auf der Myotubenoberfläche abgelagerten Proteinen der Basalmembran. Durch diese Interaktion wird ein enger Kontakt zwischen den Zellen hergestellt und damit die Fusion begünstigt.

Über den Mechanismus der Wechselwirkung von Zellen mit Matrixproteinen im allgemeinen ist nur wenig bekannt. Für das Absetzen auf den interstitiellen Kollagenen wie auch für das Anlagern an die Basalmembran benötigen die Muskelzellen spezielle Erkennungsmechanismen. Es wurden rezeptorähnliche Komponenten auf Zelloberflächen postuliert, über die derartige Erkennungsphänomene verlaufen sollten. Als mögliche Rezeptoren sah man Ganglioside (Kleinman, 1979b), Lektine (Teichberg, 1975), Proteoglykane (Culp, 1978) und Glykoproteine (Goldberg, 1979) an; eindeutig charakterisiert

wurden sie bisher jedoch nicht.

Ziel weiterführender Untersuchungen war es deshalb, die Zell-Zell- und Zell-Matrix- Wechselwirkungen auf molekularer Ebene genauer zu analysieren. Dabei stand vor allem die Laminin-bindende Membrankomponente im Vordergrund, da der Zell-Laminin-Interaktion bei der Muskelzellfusion eine Schlüsselrolle zukommt.

Ausgangsmaterial für die Isolierung des Lamininrezeptors waren Plasmamembranen, die aus Zellen und Muskelgewebe gewonnen wurden (Cates und Holland, 1978). Die Reinigung geschah über eine Affinitätschromatographie; für die Überprüfung der Bindungseigenschaften boten sich Radiobindungstests an.

ERGEBNISSE

1. Reinigung der Zellmembranen

Zellmembranen wurden von Zellkulturen (L6 Muskelzellen, Mäusemuskelfibroblasten), embryonaler Muskulatur (Huhn) sowie der Oberschenkelmuskulatur von Mäusen gewonnen und durch Dichtegradientenzentrifugation auf einem Sucrosegradienten angereichert (Cates and Holland, 1978). Die Matrixproteine, in erster Linie Kollagen, Fibronektin und Laminin werden auf dem Sucrosegradienten abgetrennt. Sie präzipitieren als komplexes Material vollständig, oder verbleiben in gelöster Form in der 8,5 % Sucroseschicht (nicht gezeigt). Abb. 33 zeigt die Membranpräparationen verschiedener Zelltypen. Man erkennt sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede in der Proteinzusammensetzung der einzelnen Plasmamembranen.

2. Bindung von Laminin an Membranen

Mit Hilfe des ELISA's war gezeigt worden, daß Muskelzellmembranen in der Lage sind Laminin zu binden (Tab. 2). Zur elektronenmikroskopischen Darstellung des Membran-Lamininkomplexes wurden Membranenvesikel mit Laminin in Triäthanolamin-Puffer inkubiert, und nach Schrägbedampfung mit Platin im Elektronenmikroskop dargestellt. Auch in Gegenwart von Detergentien bleibt die Bindungsfähigkeit der Membranen für Laminin erhalten. Ein Vorteil des

Detergens ist es, daß anstelle von Aggregaten kleinere Vesikel entstehen. Während der Vesikeldurchmesser in TEA-Puffer 50 - 400 nm beträgt, verringert sich ihr Durchmesser in TEA-Nonidet P 40 auf etwa 50 nm, in TEA-Deoxycholat auf 15 - 35 nm (nicht gezeigt).

Mit welchem Teil des Moleküls das Lamininmolekül an die Membranen bindet, geht aus den elektronenmikroskopischen Bildern jedoch nicht eindeutig hervor. Bedingt durch die Größe der Vesikel legt sich das Molekül mit einer großen Fläche auf die Partikel, so daß über die exakte Bindungsstelle keine Aussagen möglich sind. Dennoch hat es den Anschein, als ob sich das Laminin oftmals mit den globulären Teilen seiner kurzen Arme an die Membranen anheftet (nicht gezeigt).

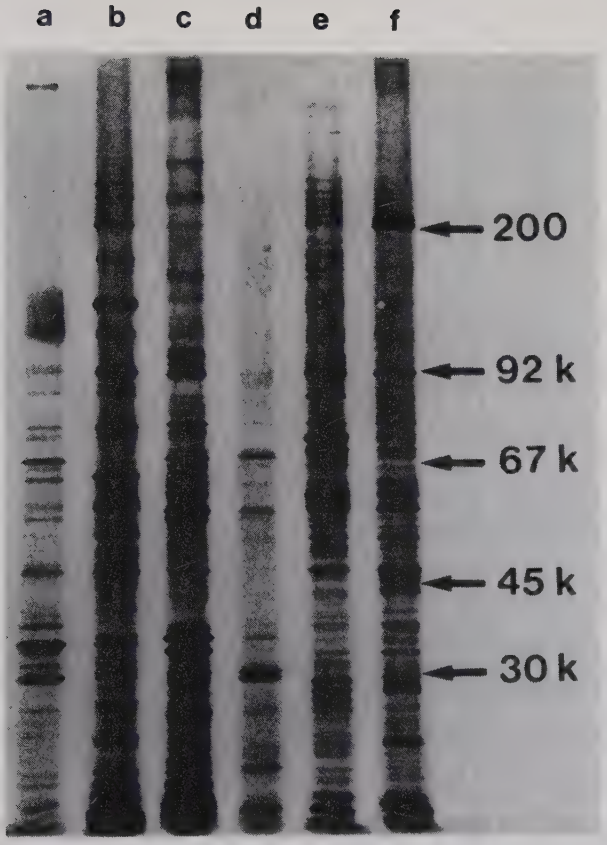


Abb.33: Isolierte Membranen verschiedener Zelltypen, aufgetrennt auf einem 5-18 % SDS-Polyacrylamidgradientengel. (a) Myoblastenmembranen, (b) Fibroblastenmembranen gereinigt auf einem Polyäthylenglycol-Gradienten, (c) Fibroblastenmembranen, (d) Chondrocytenmembranen, (e) Gehirnmembranen, (f) Gemisch von Gesamtmembranen ohne Knorpel.

3. Identifizierung einer Laminin-bindenden Membrankomponente

Zur Identifizierung Laminin bindender Zelloberflächenkomponenten wurden Membranen von Mausmuskulatur nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel elektrolytisch auf Nitrozellulosepapier transferiert (Western Blot) und mit ^{125}J-markiertem Laminin inkubiert. Nach intensivem Waschen mit TEA-Desoxycholat Puffer (TEA-Doc) zeigte sich in der anschließenden Autoradiographie eine prominente Bande vom MG 68000 (Abb. 34,a) neben vier weiteren schwächeren Banden.

4. Reinigung des 68K-Proteins

Die Anreicherung eines Proteins mit gleichem Molekulargewicht gelang durch Affinitätsschromatographie an Sepharose-gekoppeltem Laminin. Hierzu wurde die gesamte Membranfraktion mit ^{125}J jodiert, durch Ultraschall in Triethanolamin-Puffer pH 7,5 mit 0,1% NP-40 (TEA-NP) gelöst und auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Etwa 13% des aufgetragenen Materials wurden gebunden und bei ca. 50 mM NaCl mittels eines Salzgradienten (0 - 0,5 M NaCl) eluiert (Abb. 35, 36).

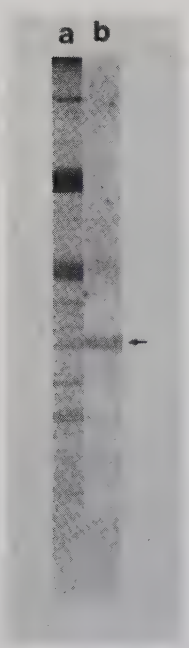


Abb. 34a

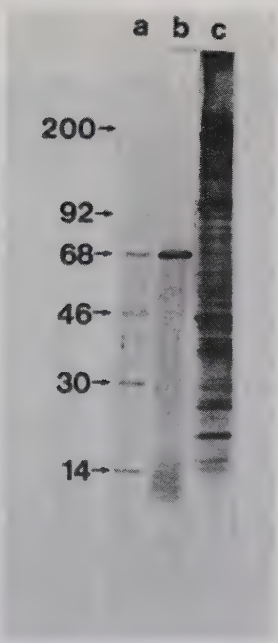


Abb. 34b

Abb.34a: Bindung von ^{125}J-Laminin an isolierte Muskelzellmembranen. Die Membranen wurden auf einem 5-18 %igen SDS-Gradientengel aufgetrennt, auf Nitrozellulosepapier transferiert und mit jodiertem Laminin inkubiert (b). (a) Inkubierte Membranen nach Färbung des Nitrozellulosepapiers mit Amidoschwarz.

Abb.34b: SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese des Laminin-bindenden Proteins (68K-Protein) nach Rechromatographie an Lamininsepharose in TEA-DOC Puffer (b), isolierte Muskelzellmembranen (c), Molekulargewichtsstandard (x1000) (a). 5-18% Gradientengel, gefärbt mit der Silbermethode.

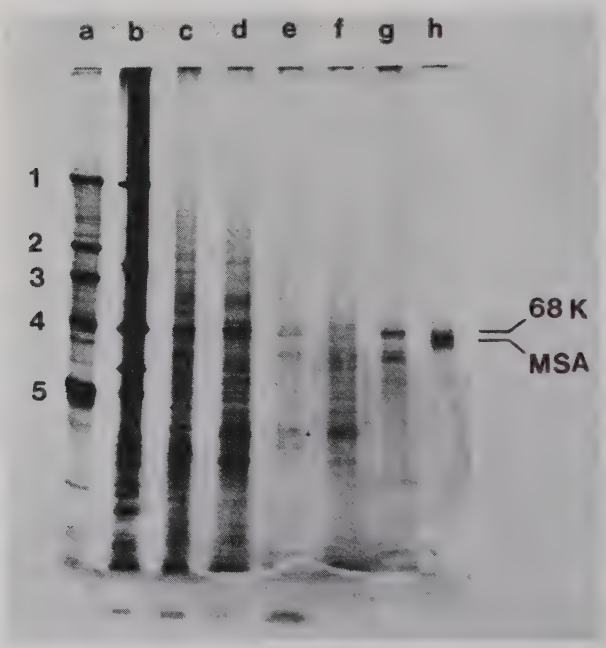


Abb.35: Anreicherung eines Lamininbindenden Proteins durch Affinitätschromatographie. (a) Molekulargewichtsstandard (1: 200K, 2: 116K, 3: 92K, 4: 65K, 5: 30K). (b) Durchlauf und gebundenes Material (c) der ersten Laminin-Sepharose, (d) Durchlauf und gebundenes Material (e) der Fibronektin-Sepharose, (f) Durchlauf und gebundenes Material (g) der zweiten Lamininsepharose, (h) Mausserumalbumin (MSA). Das 5-18 %ige Gel wurde mit der Silbermethode gefärbt.

Zur weiteren Reinigung wurde das eluierte Material über Nacht salzfrei dialysiert und anschließend über eine Fibronektinsepharose gegeben. Nach erneuter Rechromatographie der an Fibronektin nicht bindenden Fraktion an Laminin wurde mit 0,1 M NaCl das stark angereicherte Protein mit einem Molekulargewicht von 68000 eluiert (Abb. 35,g).

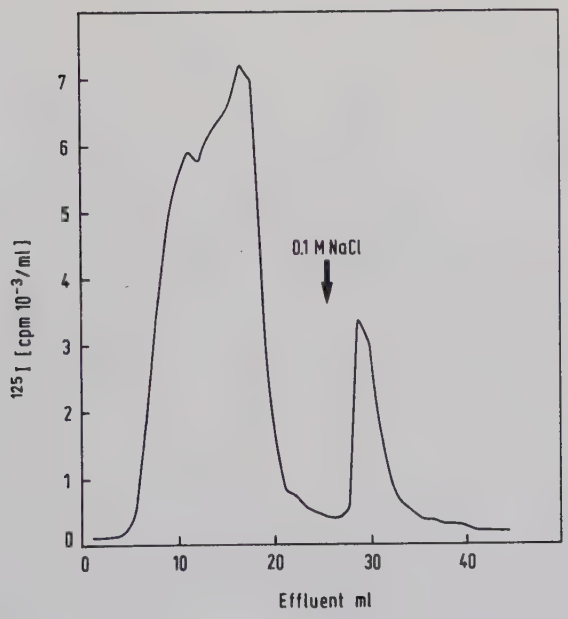


Abb.36: Affinitätschromatographische Reinigung eines Laminin-bindenden Proteins (68K-Protein). Isolierte Zellmembranen wurden durch Ultraschallbehandlung in TEA-NP Puffer gelöst, auf eine Lamininseharosesäule aufgetragen, und das gebundenen Material mit 0,1 NaCl in TEA-Puffer eluiert.

Die vollständige Reinigung des 68K-Proteins gelang durch einen Wechsel des Detergens während der zweiten Chromatographie an Laminin-Sepharose. Vor der Elution des Materials mit NaCl wurde die Säule mit TEA-DOC-Puffer gespült. Ein geringer Teil des gebundenen 68K-Proteins ging hierbei zwar verloren, doch war der Materialverlust gering, wenn die Säule mittels eines Gradienten von 0 - 0.1 % Deoxycholat umäquilibrierte wurde. Heruntergewaschen von der Säule wurden dagegen die noch gebundenen Reste kontaminierender Proteine. Nach der Elution mit 0.1 M NaCl in TEA-DOC wurde das Protein durch Dialyse gegen destilliertes Wasser präzipitiert. Das so gereinigte Protein zeigt in der SDS-Gelelektrophorese eine prominente Bande vom MG 68 000 (Abb. 34,b). Sein Anteil an der Gesamtproteinmenge der Muskelmembranen betrug zwischen 0.5 und 1 %.

5. Aminosäurezusammensetzung des 68K-Proteins

Tab. 6 zeigt die Aminosäurezusammensetzung des gereinigten 68K-Proteins. Serin und Glycin sind die am stärksten vertretenen Aminosäuren. Das Protein ist auch reich an Glutamin- und Asparaginsäure (bzw. Glutamin und Asparagin). Der Gehalt an hydrophoben Aminosäuren ist dagegen nicht ungewöhnlich hoch.

Im SDS-Polyacrylamidgel wandert das 68K-Protein im gleichen Bereich wie das BSA des Molekulargewichtstandards. Der Vergleich der Aminosäureanalyse mit Mausserumalbumin weist jedoch eindeutige Unterschiede auf. Sie unterscheiden sich insbesondere in ihrem Gehalt an Serin, Glycin, Cystein und Leucin (Tab. 6). Zusätzliche Unterschiede zwischen BSA und dem 68K-Protein bestehen in ihrer Wasserlöslichkeit sowie in ihrem BrCN-Spaltungsmuster (nicht gezeigt).

Hypro	0.0	(0.0)	Met	0.3	(0.3)
Asp	8.9	(8.8)	Ile	1.9	(1.3)
Thr	4.4	(4.6)	Leu	2.9	(10.3)
Ser	20.3	(3.6)	Tyr	1.6	(3.6)
Glu	17.4	(14.2)	Phe	1.5	(4.2)
Pro	2.6	(4.8)	His	2.9	(6.4)
Gly	19.3	(2.7)	Hylys	0.3	(0.0)
Ala	7.5	(9.9)	Lys	3.8	(8.5)
1/2 Cys	0.3	(6.6)	Arg	1.2	(4.0)
Val	3.2	(5.6)			

(Reste/100)

Tab. 6: Aminosäurezusammensetzung des 68K-Proteins: 50 µg 68K-Protein wurden mit 6 N HCL bei 108 °C 14 h unter Stickstoff hydrolysiert und auf einem Durrum Aminosäure-analysator analysiert. Die Werte sind Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Analysen. Die Aminosaurezusammensetzung von Mausserumalbumin ist in Klammern angegeben.

6. Bindung des 68K-Proteins an Matrixproteine

Die Bindungsfähigkeit des 68K-Proteins für Laminin bleibt auch beim isolierten Protein erhalten. Die Affinität des 68K-Proteins für Laminin wurde mit Hilfe eines Solid-phase Radiobindungstests ermittelt. Das gereinigte 68K-Protein wurde jodiert und mit verschiedenen an BrCN-aktivierte Sepharose gekoppelte Matrixkomponenten wie Laminin, Fibronektin, Typ I und IV Kollagen in Gegenwart von Detergens inkubiert.

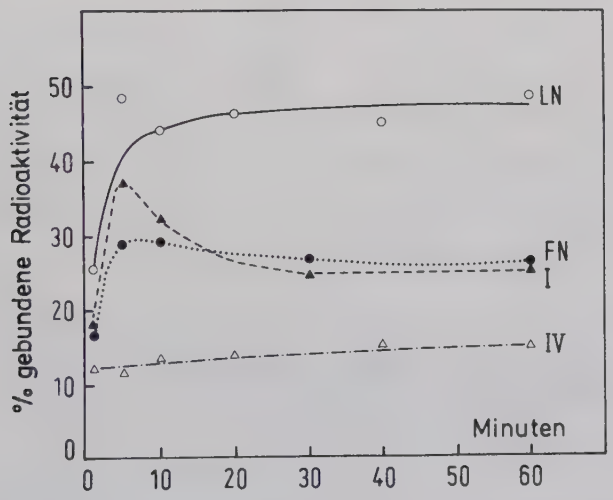


Abb.37: Bindung des jodierten 68K-Proteins an verschiedenen Matrixproteine. ^{125}J-markiertes 68K-Protein wurde in TEA-NP Puffer mit an Separose gekoppeltem Laminin, Fibronektin, Typ I und IV Kollagen inkubiert. Nach Waschen der Sepharosebeads wurde die gebundene Radioaktivität gemessen.

Die Bindung an Laminin verläuft sehr rasch und erreicht bereits nach wenigen Minuten ihren maximalen Wert (Abb. 37). Fibronektin und Typ I Kollagen wurden ebenfalls, wenn auch im geringeren Ausmaß gebunden. Nach 30 min ist etwa doppelt soviel 68K-Protein an Laminin-Sepharose gebunden, wie an Fibronektin- oder Typ I Kollagensepharose. Auch die Geschwindigkeit der Reaktion ist mit diesen beiden Proteinen zu späteren Zeitpunkten verlangsamt (Abb. 37). Typ IV Kollagen wird vom 68K-Protein dagegen nicht gebunden.

7. Integration des 68K-Proteins in Liposomen

Um die Löslichkeit des Laminin bindenden Proteins zu gewährleisten, waren die Tests, wie auch die Chromatographien, in detergenshaltigen Puffern durchgeführt worden. Dies mag eine Erklärung dafür sein, daß die Bindung nicht streng spezifisch für Laminin war, sondern auch andere Proteine gebunden wurden. Auch für die geringe Bindungsstärke dürfte das Detergens mit verantwortlich sein.

Eine Möglichkeit mit Membranproteinen ohne Detergentien zu arbeiten besteht darin, das Protein in künstliche Lipidvesikel (Liposomen) zu integrieren und somit an der Aggregation zu hindern.

Liposomen wurden durch Ultraschallbehandlung aus Lecithin in TEA-Puffer hergestellt und das 68K-Protein bei 4 ^{o}C in die erhaltene Liposomensuspension eingerührt. Lipidgebundenes 68K-Protein wurde von freiem 68K-Protein durch Sucrose-

gradientenzentrifugation abgetrennt. Inkorporation von ^{125}J-markiertem 68K-Protein in Liposomen wurde dadurch festgestellt, daß der größte Teil des Proteins (ca. 80%) in der Liposomenfraktion des Sucrosegradienten (8,5/17 % Interphase) gefunden wurde (Abb. 38).

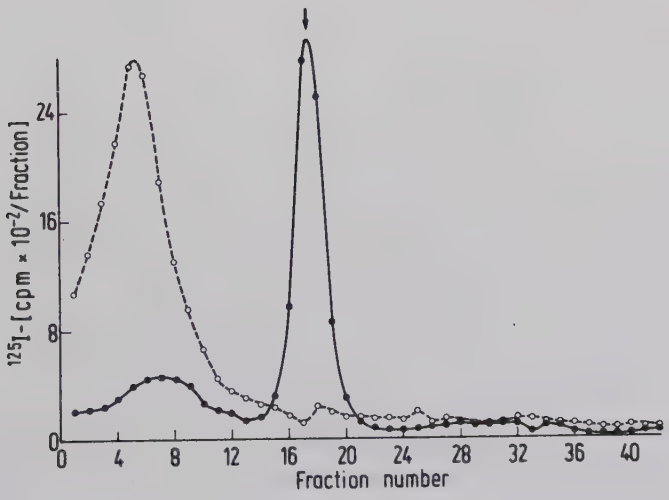


Abb.38: Einbau des 68K-Proteins in Liposomen. Die Liposomen wurden durch Ultraschallbehandlung von Lecithin in TEA-Puffer hergestellt und mit ^{125}J-markiertem 68K-Protein inkubiert. Das liposomengebundene 68K-Protein wurde auf einem Sucrosestufengradienten vom nicht eingebauten 68K-Protein abgetrennt (durchgezogene Linie). In Abwesenheit von Liposomen dringt das 68K-Protein nicht in die 8.5% Sucroseschicht ein (gestrichelte Linie).

8. Bindungstests mit 68K-Liposomen

Um die Bindung von 68K-Protein an Laminin in Abwesenheit von Detergens zu testen, wurden unmarkiertes 68K-Protein wie oben beschrieben in Liposomen inkorporiert, und der 68K-Protein-Liposomenkomplex durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Die isolierten 68K-Liposomen wurden mit ^{125}J-Laminin inkubiert, und das freie Laminin vom liposomengebundenen Laminin durch erneute Zentrifugation abgetrennt. Während das an die 68K-Liposomen gebundene Laminin an der 8,5/17 % Grenzschicht pelletierte, verblieb das nichtgebundene Laminin in der 8,5 % Sucroseschicht (Abb. 39,c). Etwa 20 % des angebotenen ^{125}J-markierten Laminins wurden in TEA-Puffer an die 68K-Liposomen gebunden (Abb. 39,a).

Bemerkenswert ist, daß ohne Detergentien auch in Gegenwart größerer Salzmengen eine Bindung zwischen Laminin und dem 68K-Protein stattfindet. Sie ist unter physiologischen Bedingungen (150 mM NaCl) gegenüber dem salzfreien TEA-Puffer sogar auf über 30 % erhöht (Abb. 39,b).

In ersten Bindungsstudien zeigte sich, daß andere Proteine wie Fibronektin oder Kollagene unter diesen Bedingungen zu weniger als 3 % gebunden werden (nicht gezeigt).

Weitere Erhöhung der Salzkonzentration führt zu keiner verstärkten Bindung von Laminin. Stattdessen präzipitiert das Laminin bei einer Konzentration von über 0,5 M NaCl. Das

ausgefallene Material sammelte sich an der 17/40 % Grenzschicht des Sucrosegradienten und konnte somit eindeutig von dem gebundenen Protein unterschieden werden (nicht gezeigt).

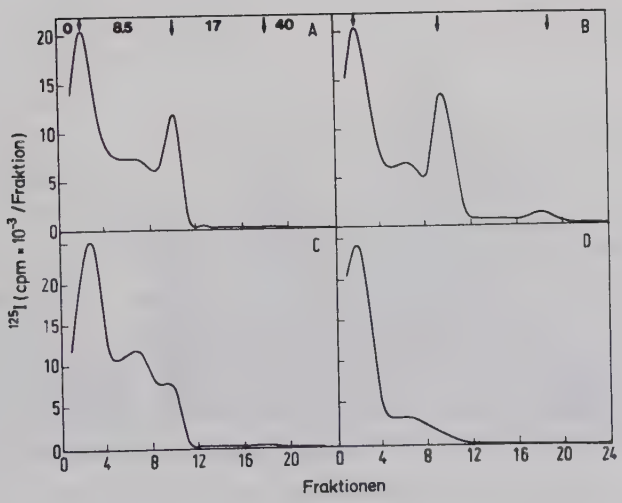


Abb.39: Bindung von ^{125}J-markiertem Laminin an 68K-Liposomen und proteinfreie Liposomen. Unmarkiertes 68K-Protein wurde in Lecithinvesikel integriert und mit ^{125}J-markiertem Laminin inkubiert. Die Abtrennung vom nicht gebundenem Laminin erfolgte auf einem Sucrose Stufengradienten. Bindung in TEA-Puffer ohne NaCL (A) und bei Anwesenheit von 0,15 M NaCL (B). Kontrolle nach Inkubation mit proteinfreien Liposomen (C) und ohne Liposomem (D) verbleibt das Laminin auf der Spitze des Gradienten.

9. Lokalisierung des 68K-Proteins in Geweben und Zellkulturen

Um das 68K-Protein im Gewebe und auf Zelloberflächen zu lokalisieren, wurden Kaninchen mit dem gereinigten Protein immunisiert. Die Reinigung der Antiseren durch Affinitätschromatographie am Antigen unterblieb wegen der geringen zur Verfügung stehenden Proteinmenge, so daß die ersten Untersuchungen mit Vollserum duchgeführt werden mußten. Auch für die Inhibition der Laminin/68K-Wechselwirkung wurde dieses Serum, bzw. F_{ab}-Fragmente hiervon verwendet.

9.1 Charakterisierung des 68K-Antiserums

Eine quantitative Titration des Antiserums gegen gereinigtes Antigen im RIA oder ELISA konnte wegen der ungenügenden Antigenmengen ebenfalls nicht durchgeführt werden. Es liegen daher nur unvollständige Ergebnisse vor.

Im Immunblotting Experiment mit Muskel- und Limb bud Membranen reagiert der Antikörper am stärksten mit einem Protein im Molekulargewichtsbereich des 68K-Proteins. Zusätzlich werden aber auch noch 3 oder 4 andere Banden höheren und niedrigeren Molekulargewichts angefärbt (nicht gezeigt). Ob zwischen diesen und dem 68K-Protein eine Beziehung besteht, ist gegenwärtig noch nicht bekannt.

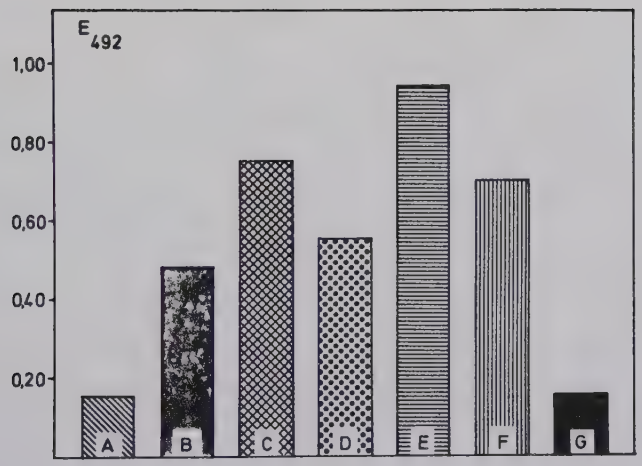


Abb.40: ELISA-Test des 68K-Antiserums gegen isolierte Zellmembranen verschiedener Herkunft. Die Microtiterplatten wurden beschichtet mit Membranen von (A) Knorpelzellen, (B) Fibroblasten, (C) Gehirn, (D) Gesamtgewebe ohne Knorpel, (E) Muskel der 32/40 % Sucrosegrenzschicht, (F) Muskel der 17/32 % Sucrosegrenzschicht. (G) Untergrund.

Im ELISA reagiert das Antiserum mit verschiedenen Zellmembranen, z.B. denen des Muskels, vom Gehirn oder von Fibroblasten (Abb. 40). Keine Reaktion findet dagegen mit Chondrocytenmembranen und Knorpelgewebe statt. Letzteres wird in der Immunfluoreszens auch im Gewebe nicht angefärbt (nicht gezeigt).

In Muskelzellkulturen läßt sich das 68K-Protein mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik auf der Oberflache einkerniger Myoblasten und in einem diffusen Muster auch auf der Myotubenoberfläche lokalisien. Auf diesen einkernigen Zellen ist der Lamininrezeptor ähnlich verteilt, wie das Laminin selbst (vergl. Abb. 41, c und d). Besonders proliferative Muskelzellen reagieren intensiv mit dem Antikörper, ebenso wie große Zellen unbekannter Herkunft, bei denen das 68K-Protein unterhalb der Zellen zu liegen scheint (U.Kühl, in Vorber.).

In Gewebsschnitten werden ähnliche Strukturen im Muskel angefärbt wie mit Antikörpern gegen Laminin. Allerdings reagiert das anti-68K Serum nicht generell mit Laminin oder anderen Basalmembrankomponenten. Färbt man z.B. den parietalen Dottersack (PYS), bleibt die Basalmembran selbst negativ. Nur die parietalen, nicht aber die visceralen Zellen, werden auf ihren Oberflächen angefärbt (Abb. 41,a).

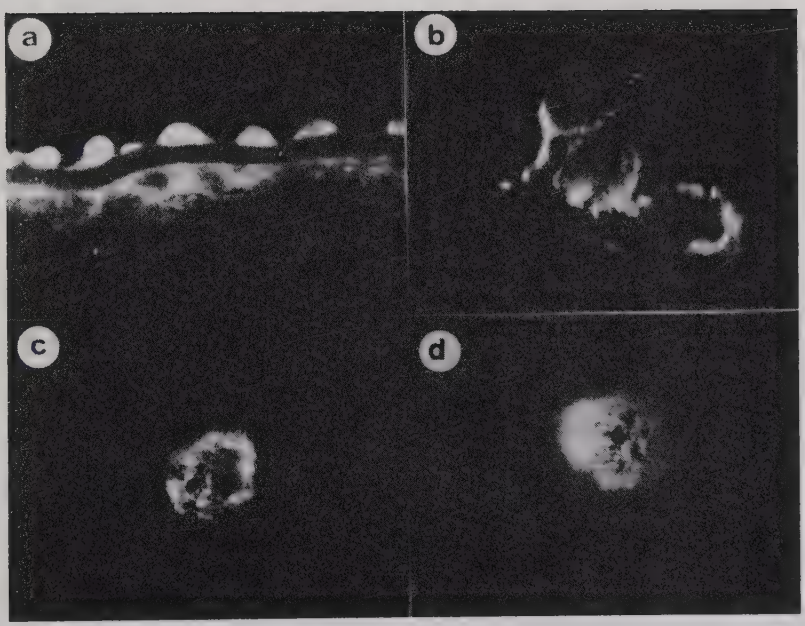


Abb.41: Lokalisation des 68K-Proteins auf Myoblasten und Zellen des parietalen Dottersackes (PYS) der Maus. (a) Färbung des parietalen Dottersackes (PYS); nur die Zellen zeigen auf ihrer Oberfläche eine positive Reaktion, die Basalmembran und das darunter liegende Gewebe sind negativ. (b und c) Nachweis des Lamininrezeptors (68K-Protein) auf einkernigen Muskelzellen. Es wurde auf den Rand (b) und auf die Oberfläche (c) der Zellen fokussiert. (d) Oberflächenfluoreszenz von Laminin auf einem einkernigen Myoblasten.

Die Bindung von Laminin an 68K-Liposomen wird durch das hier verwendete Antiserum mit niedrigem Titer nur schwach inhibiert. Erste Tests ergaben lediglich eine Reduktion der Bindung um 10 - 15 %. Mit neueren Antiseren, die einen besseren Titer aufweisen, konnte dagegen die Bindung von Laminin an Muskelzellen um mehr als 60 % erniedrigt werden (nicht gezeigt).

DISKUSSION

Die extrazelluläre Matrix besitzt im Skelettmuskel neben rein mechanischen Aufgaben als Stützfunktion bei der Kraftübertragung während der Embryogenese auch einen Einfluß auf das Wachstum und die Entwicklung der Skelettmuskelzellen. Die Frage nach der Synthese der Matrixmoleküle, der Ausbildung der Matrix sowie Untersuchungen über Art und Auswirkung der Wechselwirkungen von Muskelzellen mit dem umgebenden Gewebe führte zu einer Reihe von Beobachtungen, die hier noch einmal kurz zusammengefaßt werden sollen:

(1) Proliferative Myoblasten produzieren Kollagene, Fibronektin und Laminin. Postmitotische Muskelzellen und zu Myotuben fusionierte Myoblasten synthetisieren generell keine Proteine der extrazellulären Matrix.

(2) Die interstitiellen Kollagene Typ I, III und V, sowie Fibronektin werden in Zellkultur in eine extrazelluläre Matrix eingebaut, die dem Endomysium *in vivo* entspricht.
Typ IV Kollagen und Laminin werden in Zellkultur auf der Oberfläche der Myotuben abgelagert und bilden komplementär zur Basalmembran *in vivo* eine rudimentäre Basalmembran aus.

(3) Muskelfibroblasten synthetisieren nicht nur Typ I, III

und V Kollagen, sondern auch Komponenten der Basallamina (Laminin und Typ IV Kollagen). Sie sind eventuell entscheidend an der Basalmembranbildung auf Myotuben beteiligt.

(4) Myoblasten besitzen eine selektive Affinität zu Typ IV Kollagen, die durch Laminin verstärkt wird; Fibroblasten binden eher an Typ I und III Kollagen über Fibronektin.
Der selektiven Affinität von Myoblasten zu einem Laminin-Typ IV Komplex kommt eventuell eine Schlüsselrolle bei der zur Fusion führenden Interaktion von Myoblasten mit Myotuben zu.

(5) Ein Laminin-bindendes Protein, das für die Wechselwirkung von Muskelzellen mit der Basalmembran verantwortlich ist, wurde aus Muskelzellmembranen isoliert. Es könnte ebenfalls bei der Verankerung der Basallamina auf dem Plasmalemma von Bedeutung sein.

Charakterisierung des Zellkultursystems

Voraussetzung für die in vitro Untersuchungen der Matrixsynthese und von Zell-Matrix-Wechselwirkungen war die Etablierung eines homogenen und definierten Zellsystems. Bedingt durch die Heterogenität der Muskulatur enthalten primär erhaltenen Muskelzellkulturen verschiedene andere Zelltypen, die sich mit den in der Literatur angegebenen Selektionsmethoden oftmals nur ungenügend abtrennen lassen.

Eine gute Moglichkeit, relativ homogene Muskelzellkulturen in großen Mengen zu erhalten, bietet das Wachtelzellsystem (Lipton, 1977a; Konigsberg, 1971), das von Sasse (1981) näher charakterisiert wurde. Da zunächst jedoch gegen Huhn oder Wachtel Typ IV-Kollagen keine Antikorper zur Verfügung standen, war es notwendig, auch für Myoblasten von der Maus oder vom Menschen spezielle Anreicherungsmethoden zu entwickeln.

Die Reinigung derartiger Muskelzellkulturen gelang durch Kombination verschiedener Anreicherungsmethoden, wie dem Abtrennen der Nichtmuskelzellen auf Gewebekulturschalen ohne Kollagensubstrat (Richler und Yaffe, 1970) und der weiteren Reinigung durch selektives Ablösen der Myoblasten von kollagenhaltigen Substraten mittels vorsichtiger Enzymbehandlung (Konigsberg, pers. Mitt.).

Diese Methode ermöglichte es, auch Mausmyoblasten in so großen Mengen rein zu erhalten, daß biochemische und biologische Tests durchgeführt werden konnten.

Untersuchungen an Muskelzellkulturen werden nicht nur durch kontaminierende Zelltypen, sondern darüberhinaus auch durch die Heterogenität der Myoblasten selbst erschwert, die in verschiedenen Differenzierungszuständen vorliegen. So findet man proliferative und postmitotische Myoblasten neben bereits ausgebildeten Myotuben. Auffällig in Muskelzellkulturen sind auch eine Anzahl von großen, fibroblastenartigen Muskelzellen, die sich morphologisch nicht von echten Muskelfibroblasten abgrenzen lassen. Die Herkunft dieser

Zellen, die auch in hochreinen Kulturen z.B. am Rand von Myoblastenklonen auftreten, ist ungewiß. Es wird vermutet, daß diese Zellen untypischer Myoblastenmorphologie Muskelvorläuferzellen darstellen (Bischoff und Holtzer, 1968; Abbott, 1974; Lipton, 1977a). Aber auch ein dedifferenzierter Myoblastentyp mit fibroblastenartiger Morphologie, der seine muskelspezifischen Eigenschaften bewahrt hat und unter bestimmten Bedingungen zur Fusion fähig ist, wird diskutiert (White et al., 1975; O'Neill und Stockdale, 1974).

Diese Zellen werden bei verlängerter Kulturdauer in Myoblastenkulturen angereichert. Ihre erhöhte Syntheseleistung ist eventuell verantwortlich für das Vorliegen größerer Kollagenmengen nach Eintritt der Fusion (Mayne und Strahs, 1974). Daneben ist allerdings auch eine Kontamination mit echten Fibroblasten nicht vollständig auszuschließen.

"Dedifferenzierung" oder Verlust des Zellphänotyps bei verlängerter Kulturdauer ist für viele Zellen wie Chondrocyten, Cornea- oder Sehnenfibroblasten ein bekanntes Phänomen. Auch diese Zellen neigen in diesen Fällen zu erhöhter Kollagenbiosynthese (Benja et al., 1977; Müller et al., 1977; Conrad et al., 1980; Herrmann et al., 1980).

Der Anteil dieser untypischen Muskelzellen kann von Kultur zu Kultur ganz erheblich differieren. Vor allem in Massenkulturen, in denen konfluente Zellschichten vorliegen, werden hierdurch Aussagen über Proteinsynthese eines

einzelnen Zelltyps oder die Ergebnisse von Untersuchungen über Zellfusionsraten ganz erheblich beeinflußt.

Diese Schwierigkeiten können durch Einsetzen von Klonkulturen teilweise umgangen werden. Hierbei werden die Kulturen in so geringen Dichten angelegt, daß zunächst isolierte Einzelzellen vorliegen, die durch Proliferation zu klonalen Kolonien heranwachsen. Die Anwesenheit von Myotuben charkterisiert einen derartigen Klon dann als Muskelzellklon.

Leichter in der Handhabung als Einzelzellklone sind "Massenklonkulturen" (Sasse, 1981), in denen eine Vielzahl - jedoch unterscheidbarer - Muskelkolonien heranwächst. Auch bei ihnen läßt sich leicht nachprüfen, daß alle wohlausgebildeten Kolonien Muskelschläuche enthalten, also Muskelklone sind.

Wie die Massenkulturen enthalten auch die Massenklonkulturen fibroblastenartige Zellen innerhalb der fusionierten Myoblastenkolonien; reine Fibroblastenklone sind jedoch äußerst selten.

Biosynthese der Matrixproteine

Es war lange Zeit unklar, welche Zellen für die Synthese der Matrixproteine im Skelettmuskel verantwortlich sind. Man schrieb diese Fähigkeit zunächst den fibroblastenartigen Zellen im Muskel zu. Mayne und Strahs (1974) gelang es dann aber, Typ I Kollagen in Hühnermuskelzellen nachzuweisen, die

einen hohen Fusionsgrad aufwiesen und weniger als 10 % einkernige Myoblasten enthielten. Sie nahmen an, daß die Myotuben für die Synthese dieses Proteins verantwortlich seien. Ähnlich konnte Bailey (1979) Typ I und III erst nach Beginn der Fusion erkennen, und auch der Anteil an Fibronektin scheint erst nach Bildung der Myotuben stark zuzunehmen (Hynes, 1982).

Jedoch erst die Trennung der verschiedenen Zelltypen erlaubte es, die Syntheseleistung des jeweils einzelnen Zelltypen genauer zu bestimmen. Der biochemische Nachweis der Proteinsynthese konnte zwar die Fähigkeit der Muskelzellen zur Produktion der Matrixbestandteile belegen, gab aber keine Auskunft darüber, ob diese Proteine von den Myoblasten oder den Myotuben stammen. Ebensowenig ließ sich entscheiden, ob die Muskelzellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien verschiedene Proteine produzieren. Vor allem bei der Synthese der Basalmembranproteine Typ IV Kollagen und Laminin hatten wir einen Beitrag der Myotuben zu erwarten, da speziell sie sich mit einer Matrix aus diesen beiden Komponenten umgeben. Kulturen mit 100 % reinen Myotuben waren nicht zu erhalten. Nur die Immunfluoreszenz mit der Möglichkeit, einzelne Zellen für sich zu analysieren, konnte eine Antwort auf diese Frage geben.

Im Gegensatz zu den von Mayne und Bailey erhaltenen Daten hatte schon J. Sasse gezeigt, daß Typ I und III Kollagen nur von den Myoblasten synthetisiert werden (Sasse et al., 1981). Gleiches gilt, wie in dieser Arbeit gezeigt, auch für

Typ IV und V Kollagen sowie für Laminin und Fibronektin (s.a. Sasse et al., 1981).

Die Basalmembrankomponenten Typ IV Kollagen und Laminin werden überraschenderweise beide nicht von den Myotuben produziert. Die Zellen können wichtige Bestandteile der Membran, mit der sie sich umgeben, nicht selbst herstellen und sind bei der Ausbildung ihrer Basallamina auf die teilungsfähigen Myoblasten und auch auch die Fibroblasten (s.u.) angewiesen (Kühl et al., 1982).

Ein recht erheblicher Anteil der neusynthetisierten Proteine wird von den Zellen sekretiert und in die extrazelluläre Matrix eingebaut. Neben den Muskelzellen bilden die Fibroblasten die zweite Quelle für die Komponenten der muskulären ECM. Auch sie produzieren und sekretieren die interstitiellen Kollagene und Fibronektin, daneben aber auch Laminin und Typ IV Kollagen (Kühl et al., 1982).

Darüberhinaus zeigen Doppelmarkierungsexperimente mit Antikörpern gegen Matrixproteine und gegen muskelspezifisches Aktin, das erst in späten Entwicklungsstadien der Muskelzellen vorliegt, daß die Matrixproteinsynthese bereits vor der Fusion gestoppt wird, sobald die Myoblasten anfangen, muskelspezifisches Aktin zu synthetisieren.

Alle Matrixproteine werden also nur von jungen, teilungsfähigen Myoblasten synthetisiert. Werden die Zellen postmitotisch, endet die Matrixproduktion und wird auch zu

einem späteren Zeitpunkt, wenn die Zellen fusioniert sind, nicht wieder aufgenommen (U. Kühl, in Vorber.).

Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit Ergebnissen von Garrells (1979), der bei L6-Zellen eine mehr als 1000fache Abnahme der Kollagenbiosynthese nach der Fusion feststellte.

Ausbildung der extrazellulären Matrix

Die interstitiellen Kollagene Typ I, III und V sowie Fibronektin werden von den Zellen sekretiert und in ein extrazelluläres Netzwerk eingelagert, das die einkernigen Zellen und die Myotuben umhüllt. Diese Matrix ist in Zusammensetzung und Struktur dem Endomysium vergleichbar. Die Ausbildung der Matrix ist von der Zahl der Zellen abhängig. Die Netzwerke verdichten sich rasch mit zunehmender Zellzahl und Alter der Kulturen; sie lassen sich aber auch in Klonkulturen nachweisen, obgleich sie hier spärlicher ausgebildet sind.

Diese Befunde stehen teilweise im Gegensatz zu Beobachtungen von Lipton (1977b), der in elektronenmikroskopischen Untersuchungen an reinen Myoblastenklonen weder Kollagenfibrillen in der ECM noch eine Basalmembran nachweisen konnte. Diese Strukturen wurden nur in Mischkulturen mit Fibroblasten gefunden. Er vermutete, daß ein Fehlen einer Prokollagenpeptidase (Goldberg, 1977) in Muskelzellkulturen hierfür verantwortlich sei. Hierdurch könnten die

Vorläuferformen der Proteine nicht in die Kollagene überführt werden und sich somit auch nicht zu den Kollagenfibrillen der ECM zusammenlagern.
Wir nehmen hingegen an, daß das Auftreten einer Kollagenmatrix auch in Klonkulturen auf die Verwendung von frischem Ascorbat im Medium zurückzuführen ist (Sasse et al., 1981). Ascorbat ist für die Hydroxylierung und Sekretion des Prokollagens notwendig (Prockop et al., 1976) und stimuliert die Ausbildung einer Kollagenmatrix in Zellkulturen (De'Clerk et al., 1980). Allerdings wurden in Übereinstimmung mit Lipton, auch in den hier beschriebenen Experimenten bestätigt, daß in Massenkulturen, d.h. bei Anwesenheit von Fibroblasten, die Ausbildung der extrazellulären Matrix gegenüber Klonkulturen verstärkt ist (s.u.).

Eine Besonderheit der Muskelzellkulturen ist der Umbau der Fibronektinmatrix zum Zeitpunkt der Fusion. Während in jungen, wenig differenzierten Kulturen Typ I Kollagen zusammen mit Fibronektin in das gleiche Netzwerk eingebaut ist, beobachtet man in Gebieten mit einer hohen Fusionsrate eine Neuorganisation. Schließlich findet man eine Fibronektinmatrix, die völlig separiert vom Typ I Kollagen Netzwerk vorliegt. Ein derartiger Umbau ist bisher bei anderen Zelltypen nicht beobachtet worden (s.S. 36). So liegt z.B. bei Fibroblasten auch nach sehr langer Kulturdauer ein Netzwerk vor, das von beiden Proteinen gemeinsam gebildet wird (Vaheri et al., 1978; Dessau et al., 1978b).

Es ist bisher nicht bekannt, was für den Umbau vor allem der Fibronektinmatrix verantwortlich ist. Die erhöhten Mengen an Proteasen, die von Myotuben synthetisiert werden könnten den Abbau begünstigen. Zusätzlich könnte auch eine veränderte Syntheserate an Proteoglykanen die Interaktionen der Zellen mit Fibronektin und Laminin differentiell beeinflussen. Myotuben produzieren erhöhte Mengen an Heparansulfat und Hyaluronsäure, dagegen weniger Chondroitinsulfat (Pacifici und Molinaro, 1980). Während Glycosaminoglykane die Bindung von Fibronektin an Kollagene verstärken (Yamada et al., 1980), scheinen für die Wechselwirkungen von Zellen mit den Matrixkomponenten die hochmolekularen Proteoglykane von größerer Bedeutung zu sein.

Sowohl die Kollagen- wie auch die Zellbindungsstelle des Fibronektins sind relativ sauer. Eine erhöhte Konzentration ebenfalls saurer Glykosaminoglykane in unmittelbarer Umgebung der Myotuben könnte somit das Trennen des Kollagen- und Fibronektinnetzwerkes in diesem Bereich ebenso erklären, wie das Fehlen oberflächengebundenen Fibronektins.

Die beschriebenen Veränderungen sind aber nicht nur auf die Matrix allein beschränkt, sondern finden auch an den Zellen selbst, bzw. an ihrer Oberfläche statt (s.u.). Von einiger Bedeutung für den Aufbau der ECM des Skelettmuskels ist die Unfähigkeit der Myotuben, bestimmte Proteine, die sie für die Ausbildung ihrer Basalmembran benötigen, selbst zu synthetisieren. Sie sind auf die Mithilfe der einkernigen

Muskelzellen angewiesen. Neben den Myoblasten sind es vor allem die Fibroblasten, die die beiden Membranproteine Laminin und Typ IV Kollagen produzieren und ins Medium sekretieren.

Die Immunfluoreszenz zeigt oberflächengebundenes Laminin auf einkernigen Myoblasten. In Massenkulturen sind auf etwa 2 bis 3 Tage alten Muskelschläuchen die ersten Anzeichen eines diffusen punkt- oder streifenförmigen Musters beider Proteine erkennbar. Mit zunehmendem Alter der Zellen verdichten sich die Proteine, ohne jedoch in eine geschlossene Schicht überzugehen. Auch nach 5 bis 6 Wochen wird in fusionierten Muskelzellkulturen selten mehr als die Hälfte der Myotubenoberfläche von den Membrankomponenten bedeckt. Bei Doppelfärbungen liegt über den größten Bereich eine Gleichverteilung zwischen Laminin und Typ IV Kollagen vor, man findet aber auch ein unterschiedliches Verteilungsmuster.

Extrazelluläre netzartige Strukturen der Basalmembranproteine Laminin und Typ IV Kollagen analog denen der interstitiellen Kollagene treten in primären Muskelzellkulturen normalerweise nur spärlich auf. Bei verzögert einsetzender Fusion und somit steigendem Anteil einkerniger Zellen werden Laminin und Typ IV dennoch vermehrt in eine netzförmige Matrix eingebaut, wie sie auch bei Muskelfibroblasten und L6-Zellen vorliegt.
Vor allem die L6-Zellen fusionieren wesentlich später als Primärzellkulturen; die im Überschuß produzierten, noch

nicht benötigten Basalmembranproteine werden deshalb verstärkt in eine unlösliche Matrix eingebaut.

Beteiligung der Fibroblasten an der Basalmembranbildung

In Muskelzellklonen ist die Menge der auf den Myotubenoberflächen abgelagerten Basalmembranproteine gegenüber fibroblastenhaltigen Massenkulturen stark reduziert. Selbst auf sehr alten Myotuben ist in der Immunfluoreszenz nach 3 bis 4 Wochen nur eine spärliche Färbung für Laminin zu erkennnen.
Betrachtet man einen derartigen Myotub aus einer Klonkultur im Elektronenmikroskop, findet man keine durchgehende Basalmembran, sondern nur unterbrochene Bereiche elektronendichten Materials, das auf eine beginnende Membranbildung hindeutet (Lipton, 1977a; Kühl et al., 1982). In Massenkulturen ist dagegen nach etwa 12 bis 14 Tagen die Basallamina auf den Muskelschläuchen durchgehend ausgebildet. Dies deutet darauf hin, daß die Fibroblasten neben den Muskelzellen an der Bildung der Basalmembran beteiligt sind.

Es ist wahrscheinlich, daß die Syntheseleistung der Muskelzellen, die eindeutig geringer ist als die der Fibroblasten, nicht ausreicht, um genügend Membranproteine zu produzieren, und die Fibroblasten die für eine vollständige Ausbildung der Basallamina fehlenden Komponenten bereitstellen.

Zur Klärung dieser Frage war der Versuch unternommen worden, den Einbau von im Medium gelösten Laminin und Typ IV Kollagen in die Basalmembran zu analysieren. Untersuchungen mit dem Medium zugesetzten FITC-markiertem Laminin hatten keine eindeutigen Ergebnisse ergeben. Da uns seit kurzem artspezifische Antikörper gegen Maus- und Huhn- Typ IV Kollagen zur Verfügung stehen (Mayne et al., 1982), war es möglich durch Kokultivierung von Myoblasten mit konditioniertem Medium von Fibroblasten oder Fibroblasten der jeweils anderen Spezies, die Ablagerung des von den Fibroblasten produzierten Typ IV Kollagens auf den Myotubenoberflächen nachzuweisen. Die Myotuben vermögen also Proteine, die von Myoblasten und Fibroblasten synthetisiert und ins Medium sekretiert werden, in die Basallamina auf ihrer Oberfläche zu integrieren (U. Kühl und K. v.d. Mark, in Vorber.).

Affinität der Muskelzellen zu Komponenten der Basalmembran

Kollagene, Laminin und Fibronektin werden als stabilisierende Strukturproteine in die Matrix der Zellen eingebaut und verleihen den Geweben ihre notwendige Festigkeit. Darüberhinaus gehen von ihnen aber auch weiterreichende Einflüsse auf die Zellentwicklung aus. Dies konnte vor allem durch die bereits erwähnten Arbeiten von Hauschka und Konigsberg (1966) gezeigt werden, die bei Skelettmuskelzellen erhöhte Fusionsraten auf kollagenhaltigen Substraten nachwiesen.

Verschmelzen Muskelzellen miteinander um Myotuben auszubilden, muß zuvor ein enger Kontakt zwischen den Zellen hergestellt werden. Dieser Vorgang läßt sich auch in Zellkultur beobachten. Einige Stunden vor der Fusion lagern sich die einkernigen Zellen dicht an- und hintereinander. Diese Phasen der Zellerkennung und der reversiblen Adhäsion ließen sich experimentell klar vom eigentlichen Fusionsprozeß, bei dem die Zellmembranen zweier benachbarter Muskelzellen irreversibel miteinander verschmelzen, abgrenzen (Nameroff und Munar, 1976; Leung et al., 1975). Sie sind abhängig von der Temperatur, dem pH-Wert und der Konzentration an Ca^{2+} Ionen (Kalderon und Gilula, 1979; Knudsen und Horwitz, 1977a,b).

In fusionierten Zellkulturen bilden sich vor allem große Myotuben, während der Anteil an kleinen Muskelschläuchen und an Verzweigungen gering ist (Bischoff und Lowe, 1974). Man kann also annehmen, daß sobald sich ein Myotub einmal gebildet hat, die verbliebenen Myoblasten bevorzugt mit diesem und nicht mit anderen fusionsfähigen, einkernigen Zellen verschmelzen.

Die hier beschriebenen Bindungsstudien weisen auf den engen Zusammenhang zwischen Affinität von Myoblasten und den Komponenten der Basalmembran hin, eine Wechselwirkung, der eventuell eine Schlüsselrolle bei der Fusion von Muskelzellen zu Myotuben zukommt. Myoblasten besitzen eine ausgeprägte Affinität zum Typ IV Kollagen, an das sie wesentlich rascher binden, als an die interstitiellen

Kollagene. Die Bindung an das Basalmembrankollagen wird durch Laminin noch erhöht. Auf den Kollagenen des Typs I, III und V fördert dieses Protein das Absetzen der Muskelzellen jedoch nicht. Diese Bindung wird durch Fibronektin vermittelt.

Trotz des attachmentfördernden Effekts des Lamininś, und obwohl Myoblasten lösliches Laminin an ihrer Oberfläche binden, können sich Muskelzellen nicht direkt an eine Lamininmatrix anheften (U. Kühl und K. v.d. Mark, in Vorber.). Hierin unterscheidet sich Laminin vom zweiten wichtigen Attachmentprotein der Myoblasten, dem Fibronektin, an das sich die Zellen auch ohne Kollagen anheften (Chiquet et al., 1978). Dieser Effekt kann an der Beschichtung der Platten liegen, wenn durch das Auftrocknen des Proteins die entsprechenden Zellbindungsstellen durch Konformationsänderungen im Molekül blockiert werden. Da sich aber andere Zelltypen wie Fibrolasten (Couchman et al., 1983) oder Epithelzellen (Terranova et al., 1980) ohne weiteres an Laminin anheften, muß man annehmen, daß Myoblasten spezielle Rezeptoren besitzen, oder zumindest empfindlicher als andere Zelltypen auf Veränderungen an der Zellbindungsstelle des Laminins reagieren.

Wechselwirkung zwischen Laminin und Typ IV Kollagen

Das Lamininmolekül besitzt zellbindende Bereiche in den globulären Domänen seiner kurzen Arme, die durch Elastase- oder V8-Proteasespaltung in aktiver Form erhalten werden

(Aumailley et al., 1983). Über die Kollagenbindungsstelle des Laminins ist dagegen wenig bekannt. Man vermutet sie im globulären Bereich des langen Armes (Timpl et al., 19). Ob wirklich eine bevorzugte Wechselwirkung mit Typ IV eingegangen werden kann, wie unsere Bindungstests zeigen, ist noch umstritten. Säulenchromatographische Untersuchungen und Ultrazentrifugationsanalysen konnten keine Wechselwirkungen zwischen beiden Proteinen aufzeigen (Timpl, pers. Mitt.). Dennoch berichtete Martin über eine spezielle Interaktion des Laminins mit Typ IV, allerdings in Gegenwart von Heparin, die im ELISA festgestellt wurden G. Martin, pers. Mitt.).

Die Besonderheit des Attachments von Muskelzellen auf einer Laminin- bzw. einer Laminin/Kollagen-Matrix wurden auch beobachtet, wenn die Bindungsstudien unter veränderten Bedingungen durchgeführt wurden.

Vergleicht man Attachmentassays, in denen nur das Typ IV Kollagensubstrat oder nur die Zellen mit Laminin inkubiert wurden mit einem Test, bei dem Laminin während der ganzen Versuchsdauer anwesend war, erhält man folgendes Bild:

(1) Das Absetzen der Zellen auf Typ IV Kollagen Substraten, die mit Laminin vorinkubiert wurden, ist stark beschleunigt.

(2) Werden die Zellen mit Laminin vorinkubiert führt dies zu einer Verlangsamung des Attachments und zu einer

starken Verminderung der insgesamt abgesetzten Zellzahlen gegenüber Versuchen, in denen das Substrat mit Laminin vorinkubiert wurde.

(3) Bei Anwesenheit von Laminin setzen sich die Zellen oftmals langsamer ab, als bei Versuchen, bei denen das ungebundenen Laminin nach Vorinkubation des Substrats durch Waschen entfernt wurde. Die ingesammt abgesetzte Zellzahl ist jedoch stark erhöht.

Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß Laminin durch die Bindung an ein geeignetes Substrat, in diesem Fall an Typ IV Kollagen, aktiviert wird, wie dies auch für Fibronektin beschrieben wurde (Klebe, 1974; Pearlstein, 1978; Grinell, 1978). Läßt man dem Laminin während der Vorinkubationsphase genügend Zeit, sich in geeigneter Weise an das Basalmembrankollagen anzuheften, so finden die Zellen eine große Anzahl von optimal aktivierten Bindungsstellen bereits zu Beginn des Tests vor und setzen sich rasch ab. Die interstitiellen Kollagene binden offensichtlich weniger Laminin als das Typ IV, oder Laminin liegt auf ihnen in einer ungünstigeren Konformation vor.

Der verstärkende Effekt fehlt, wenn die Myoblasten mit Laminin vorinkubiert wurden; die Zellen setzen sich verlangsamt ab. Was man in diesem Fall beobachtet, ist nicht die Wechselwirkung zwischen Zelle und dem Laminin/Kollagen Substrat, sondern die Bindung des zellgebundenen Laminins an Typ IV Kollagen. Daneben läßt sich auch nicht ausschließen, daß das zellgebundene Laminin keine Wechselwirkung mit dem

Kollagen mehr eingeht und ein anderer Bindungsmechanismus abläuft.

Ebenfalls keine ausreichende Aktivierung des Laminins findet statt, wenn die Attachmentassays in Anwesenheit des Attachmentfaktors, aber ohne Substratvorbehandlung durchgeführt werden. Da die Aktivierung des Laminins am Kollagen einige Zeit benötigt, ist die Geschwindigkeit des Attachments häufig erniedrigt. Daß sich in diesem Fall dennoch mehr Zellen absetzen, ist wahrscheinlich auf eine direkte Wechselwirkung zwischen zell- und substratgebundenem Laminin zurückzuführen.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch beim Absetzen von Hühnermyoblasten in Gegenwart von Fibronektin gemacht. In Untersuchungen mit Fibronektinfragmenten konnte gezeigt werden, daß auch direkte Fibronektin-Fibronektin Interaktionen zu einem vermehrten Absetzen dieser Zellen führen, wenn das Protein nach dem Vorinkubieren nicht durch Waschen entfernt wurde (Ehrismann et al., 1981).

Einfluß von Serum und Fibronektin auf die Zell-Matrix Interaktion

In Gegenwart von Serum oder Embryoextrakt haften die Myoblasten an Typ IV Kollagen nur noch unwesentlich stärker, als an andere Kollagentypen. Das Attachment ist bei Anwesenheit von Serum und Embryoextrakt aber auf allen Kollagentypen stark beschleunigt. Auch die Menge der sich absetzenden Zellen ist erhöht.

Der Effekt des Serums mag zum Teil daran liegen, daß die hierin vorhandenen Attachmentfaktoren wie Fibronektin in einer aktiveren Form vorliegen, da sie nicht wie das zugesetzte Fibronektin eine Vielzahl von Reinigungsprozeduren durchlaufen haben. Wichtiger sind aber wahrscheinlich zusätzliche im Serum und vor allem im Embryoextrakt vorkommende Faktoren, die die Bindungen mit beeinflussen. In diesem Zusammenhang sei vor allem auf die Proteoglykane wie Heparansulfat hingewiesen, die die Fibronektin-Kollagen und eventuell auch die Laminin-Typ IV Bindungen verstärken (s.u.) (Jilek und Hörmann, 1979; Johansson und Höök, 1980).

Bindung von Myoblasten an Matrixßproteine

Eine Vielzahl von Untersuchungen haben gezeigt, daß Fibronektin und Laminin als Attachmentfaktoren das Absetzen von Zellen auf einer Kollagenmatrix verstärken (Kleinman et al., 1981; Hynes und Yamada, 1982). Mesenchymale Zellen benötigen Fibronektin, um sich an die interstitiellen Kollagene anzuheften (Kleinman et al., 1981). Epithelzellen besitzen dagegen eine besondere Affinität zum Typ IV Kollagen, die durch Laminin noch verstärkt wird (Terranova et al., 1980).

Muskelzellen vereinigen die Fähigkeiten beider Zelltypen. Sie können sich sowohl über Fibronektin an Typ I, als auch über Laminin an Typ IV Kollagen binden. Ob beide Bindungsmechanismen von ein und derselben Zelle genutzt werden können, oder ob nur ein bestimmter Anteil der Zell-

population, z.B. die proliferativen Myoblasten an Typ I, III, V-Kollagen/Fibronektin (Endomysium) und die postmitotischen Myoblasten an Typ IV/Laminin (Basalmembran) anheften, ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Auf Kollagensubstraten verstärken beide Attachmentproteine die Bindung von Muskelzellen. Es existieren jedoch für beide Proteine bevorzugte Substrate, auf denen ihr Effekt besonders ausgeprägt ist.

Dies war auch bei der Reinigung von primären Muskelzellsuspensionen aufgefallen. Myoblasten setzten sich bei Anwesenheit von Laminin beschleunigt auf Typ III und IV Kollagen ab. Die Fibroblasten verblieben längere Zeit im Medium und ließen sich somit abtrennen. Auf Typ I und V besaß Laminin nur einen geringen Effekt. Eine derartige Separation fand auf diesen Substraten ebenso wenig statt, wie in Gegenwart von Fibronektin auf irgendeinem der Kollagene.

Auch die Inhibition des Attachments von Myoblasten auf Laminin/Typ IV Kollagen Substraten durch anti-Laminin bestätigte die Hypothese unterschiedlicher Bindungsmechanismen über Laminin bzw. Fibronektin, zusätzlich zur direkten Bindung der Zellen an Kollagen. So wird das Absetzen der Myoblasten durch den anti- Laminin Antikörper nur auf Typ IV und etwas auf Typ III Kollagen, kaum dagegen auf Typ I und V Kollagen reduziert.

Die hier beschriebenen Beobachtungen sprechen dafür, daß

für die Myoblasten eine rasche und intensive Wechselwirkung mit der Basalmembran wichtig ist, bevor die Fusion eingeleitet wird. Sie stehen im Gegensatz zu Beobachtungen von Ketley und Mitarbeitern, die keine Unterschiede zwischen den einzelnen Kollagentypen auf die Fusion bzw. das Wachstum von Muskelzellen gefunden hatten (Ketley et al., 1976). In diesen Arbeiten wurden jedoch nur die reinen Kollagensubstrate, bzw. natives und denaturiertes Kollagen miteinander verglichen, ohne den Einfluß weiterer Komponenten wie Fibronektin oder Laminin zu berücksichtigen. Auch bestanden die für diese Untersuchungen verwendeten Zellkulturen nicht aus reinen, sondern nur aus angereicherten Myoblasten. Die Autoren beschrieben eine Verminderung der Fusionsrate, wenn die Kollagensubstratmenge reduziert wurde. In diesen Fällen trat die Fusion erst ein, wenn sich ein Monolayer von Fibroblasten gebildet hatte und die für die Fusion der Muskelzellen notwendigen Komponenten - in erster Linie das Typ I Kollagen - von den Nichtmuskelzellen produziert worden war.

Proliferative und postmitotische Myoblasten unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Zellmembran (Yaffe, 1971; Holtzer et al., 1972; Leung et al., 1975; Chen, 1977; Furcht et al., 1977; Gartner und Podleski, 1975; 1976). Dennoch ist nicht bekannt, welche Membrankomponenten für die spezifischen Eigenschaften fusionsfähiger Zellen verantwortlich sind.

Da nur postmitotische Zellen miteinander fusionieren und

diese die Fähigkeit, Fibronektin auf ihrer Zelloberfläche zu binden bereits verloren haben (Chiquet et al., 1978), scheint der Verlust dieses Proteins eine Voraussetzung für den Fusionsprozeß zu sein. Hierfür spricht auch, daß Fibronektin nicht auf der Oberfläche von Myotuben beobachtet wird (Chen, 1977).

Die Affinität von Myoblasten untereinander und von Myoblasten zu Myotuben muß also durch andere Oberflächenkomponenten vermittelt werden. Mögliche Kandidaten für den Zell-Zell- Erkennungsprozeß sind Laminin und Typ IV Kollagen, die mit dem Verschwinden von Fibronektin auf der Myoblastenoberfläche verstärkt auftreten. Der Fusion der Muskelzellen geht eine Anlagerung der Myoblasten an die Basalmembran der Myotuben voraus, der die Zellen in einen engen Kontakt mit diesen beiden Proteinen bringt.

Die Rolle von Typ IV Kollagen und Laminin in der Fusion von Myoblasten ließ sich an Zellkulturen zeigen. Wurden den Zellen verschiedene Substrate angeboten, so erfolgte die Fusion der Myoblasten auf der Kombination Laminin/Typ IV Kollagen 12-24 h früher, als auf den Kontrollplatten. Zusätzlich trat eine verstärkte Fusion ein, die auf keiner anderen Substratkombination beobachtet wurde. Dieser Effekt ließ sich sowohl in Massenklon- als auch in echten Klonkulturen zeigen. Die Fusionsrate erreicht bei den Klonen zwar nicht so hohe Werte, wie bei Platten mit höheren Zelldichten, dennoch entwickelten die Klone auf Typ IV/Laminin mehr und größer augebildete Myotuben (Kühl, unveröff.).

Mechanismus der Myoblasten-Laminin Interaktion

Um die Interaktionen von Myoblasten mit Laminin und Kollagenen auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde es notwendig, Membrankomponenten zu isolieren, über die sich die Muskelzellen an Laminin und Kollagen anheften.

Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, daß die Bindung von Laminin an Myoblasten über ein Protein der muskulären Zellmembran verläuft, das ein Molekulargewicht von 68 000 aufweist (68K-Protein). Nach elektrophoretischer Auftrennung der Membranproteine wird die Hauptmenge radioaktiv markierten Laminins von dieser Komponente gebunden, obwohl auch noch zwei oder drei andere Banden der in einem SDS-Gel aufgetrennten Membranproteine eine schwache Wechselwirkung zeigen.

Die Isolierung des Proteins gelang durch Affinitätschromatographie isolierter Muskelzellmembranen an einer Lamininsepharose. Die weitere Reinigung erfolgte durch zusätzliche chromatographische Schritte unter teilweise veränderten Bedingungen.

Auch nach der Reinigung durch Affinitätschromatographie besitzt das isolierte 68K-Protein weiterhin die Fähigkeit, Laminin zu binden. Die spezifische Bindung bleibt auch bei höheren Ionenstärken erhalten.

Das gereinigte Protein besitzt ein Molekulargewicht von etwa 68 000. Obwohl die Aminosäureanalyse nur einen geringen

Anteil hydrophober Aminosäuren aufweist, besitzt das 68K-Protein, wohl aufgrund seiner Konformation, einen hydrophoben Charakter, und läßt sich nur in Gegenwart von Detergentien in Lösung halten.

Durch diesen Zusatz an Detergentien wird die Bindung des 68K-Proteins gegenüber Laminin stark geschwächt und durch geringe Salzmengen vollständig unterbunden. Zusätzlich treten unter diesen Bedingungen unspezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen auf. Umgehen ließen sich diese Schwierigkeiten bei Bindungstests durch Integration des 68K-Proteine in Liposomen, wodurch Untersuchungen über die Spezifität des Proteins in detergensfreien Puffern ermöglicht wurden.

Unklar ist bisher, ob das beschriebene Protein, das etwa 0,5-1 % des muskulären Gesamtmembranproteins ausmacht, einen integralen Membranbestandteil darstellt, oder lediglich mit der Zelloberfläche assoziiert ist. Hinweise für die hydrophoben Eigenschaften des 68K-Proteins liefert neben seiner Unlöslichkeit in detergenzfreien Puffern auch die Tatsache, daß es in Liposomem integrierbar ist. Trotzdem kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß das 68K-Protein nicht in die Lipiddoppelschicht der Liposomen integriert, sondern nur damit assoziiert ist.

Die Lokalisation des 68K-Proteins auf der Oberfläche der Zellen wurde mit Hilfe von Antikörpern gezeigt. Die Immunfluoreszenz mit anti-68K-Antiserum ergab eine Reaktion auf der Zellmembran von Myoblasten, Myotuben und einer Reihe

weiterer Zelltypen. Im ELISA zeigten neben Muskelzellmembranen auch Plasmamembranen anderer Zellarten wie Fibroblasten oder Gehirnzellen eine positive Reaktion.

Das 68K-Protein läßt sich sich unter anderem auch auf Limb bud Zellen nachweisen; isolierte Plasmamembranen enthalten ein Protein dieses Molekulargewichts, daß im Immunblotting Experiment mit dem 68K-Antiserum reagiert (Bee, pers. Mitt.). Chondrozyten enthalten dieses Protein jedoch nicht. Der anti-68K-Antikörper reagiert weder mit isolierten Knorpelzellmembranen, noch wird Knorpelgewebe in Gewebsschnitten angefärbt.

Obwohl die Ergebnisse nur als vorläufig zu betrachten sind, da die Reaktionen nicht mit affinitätsgereinigten Antikörpern, sondern mit Vollserum durchgeführt wurden, deuten diese Befunde darauf hin, daß auch andere Zelltypen 68K-Protein oder immunologisch verwandte Proteine auf der Zelloberfläche besitzen.

In Schnitten von Muskelgewebe und Blutgefäßen werden durch anti-68K-Proteinserum ähnliche Strukturen angefärbt, wie durch anti-Laminin. Dennoch reagiert das Serum nicht mit Basalmembranen und enthält auch keine Kontaminationen, die gegen Laminin oder einen anderen Membranbestandteil gerichtet sind. Man erkennt dies in Anfärbungen des Dottersackes. Nur die für den Aufbau der Basalmembran veranwortlichen Zellen reagieren an ihrer Oberfläche mit dem Antikörper; die Membran selbst bleibt negativ (U.Kühl, in Vorber.).

Kollagenspezifische Rezeptoren wurden von Chiang et al. (1977; 1978), Goldberg (1979) und Mollenhauer und v.d. Mark (1983) beschrieben. Ebenso Glykoproteine von Fibroblastenmembranen, die an der Kollagenbindung beteiligt sind von Letho et al. (1980), Harper und Juliano (1981) und Hughes et al. (1981).

Die beobachtete Affinität von Myoblasten zu Typ IV Kollagen ließe sich am einfachsten mit der Existenz eines für dieses Kollagen spezifischen Rezeptors erklären. Es wurden viele Versuche unternommen, einen derartigen Faktor aus Muskelzellmembranen zu isolieren. Sie führten bisher aber lediglich zu einer Anreicherung eines Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 30 000. Ob diese Komponente in irgend einer Beziehung zu dem von Mollenhauer und v.d. Mark (1983) beschriebenen Chondrocytenmembranprotein steht, das, obwohl es bevorzugt mit Typ II Kollagen reagiert, auch mit anderen Kollagentypen eine geringe Interaktion zeigt, ist bisher nicht geklärt.

In der Vergangenheit sind mehrere Membranproteine beschrieben worden, die mit der Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Wechselwirkung im Zusammenhang stehen. So fanden Öbrink (1978) und Ocklind (1982) ein Protein des Molekulargewichts 65 000, das für die Aggregation von Leberzellen des Huhns verantwortlich ist. Auch Chiang und Kang (1982) beschrieben ein 68K-Protein aus Thrombocyten, von dem bisher nicht klar ist, ob es mit dem von uns beschriebenen Protein verwandt ist.

Auch im Muskelsystem sind mehrere Membrankomponenten bekannt, denen eine Aufgabe bei Zellinteraktionen und speziell der Fusion zugeschrieben wird. Sowohl Cates und Holland (1978, 1980) wie auch Pauw und David (1978) konnten nach Jodierung von Muskelzellmembranen Proteine mit einem MG von etwa 70 000 entdecken, die erst zum Zeitpunkt der Fusion gebildet werden und einige Zeit später wieder verschwinden. Obwohl über die Funktion dieser Proteine nichts bekannt ist, ist ein Zusammenhang mit dem von uns beschriebenen Lamininrezeptor nicht auszuschließen. Gerade die Vorstellung, daß der Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktion über Laminin zum Fusionszeitpunkt eine große Bedeutung zukommen (s. Teil II, Kap. 8) ließe eine erhöhte Syntheserate für diesen Rezeptor vor dem Fusionsbeginn erwarten.

In weiteren Untersuchungen wollen wir nun versuchen, die Fusion der Myoblasten durch Zugabe von Antikörpern gegen bestimmte Matrixproteine oder deren Zelloberflächen-rezeptoren zu beeinflussen, um hierdurch eventuell die durch die Matrix und ihre Bestandteile ausgelösten Effekte auf die Zelldifferenzierun besser zu verstehen.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Wechselwirkungen von Skelettmuskelzellen mit der extrazellulären Matrix (ECM) untersucht. Das Muskelzellsystem ist ein ausgezeichnetes Modell für derartige Untersuchungen *in vitro*, da die Zellen in Zellkultur die gleichen Differenzierungsstadien durchlaufen wie *in vivo*. Zudem ist bekannt, daß die Myogenese *in vitro* durch Kollagen und Fibronektin beeinflußt werden kann.

Um zu verstehen, auf welche Weise die ECM das Wachstum und die Entwicklung der Myoblasten beeinflußt, war es zunächst notwendig, den Aufbau der ECM des Skelettmuskels zu analysieren. In Zellkulturen von embryonalen Muskelzellen wurden dem Endomysium und der Basalmembran vergleichbare extrazelluläre Strukturen gebildet. Immunfluoreszenzstudien zeigten, daß die Matrix des Endomysiums aus Typ I, III, V Kollagen und Fibronektin besteht, während die Basalmembran auf den Sarkolemmschläuchen Typ IV Kollagen und Laminin enthält. Die Kollagene Typ I, III und V des interstitiellen Bindegewebes sowie das Fibronektin bilden ein extrazelluläres, fibrilläres Netzwerk, Typ IV Kollagen und Laminin werden *in vitro* dagegen auf der Oberfläche der Myotuben abgelagert.

Eine der Kernfragen unserer Untersuchungen war, welche Zellen des Skelettmuskels die Proteine der ECM, insbesondere der Basalmembran, synthetisieren. Es konnte gezeigt werden, daß Kollagene, Fibronektin und Laminin nicht, wie bisher

angenommen von den Muskelfibroblasten, sondern auch von den myogenen Zellen synthetisiert werden. Ausschlaggebend für den Nachweis der Herkunft der Matrixproteine war, daß es gelang, Muskelzellen frei von kontaminierenden Zelltypen, insbesondere den Fibroblasten, zu züchten. Die an diesen homogenen Zellpopulationen erhaltenen Ergebnisse wurden zusätzlich durch Analysen fibroblastenfreier Muskelzellinien bestätigt.

Entgegen früher gemachten Beobachtungen, daß Kollagene und Fibronektin überwiegend nach dem Einsetzen der Fusion, von den neugebildeten polykaryotischen Myotuben produziert werden, weisen die hier gezeigten Daten darauf hin, daß die Matrixproteine vor allem aus den einkernigen Zellen des Muskelgewebes stammen. Die Biosynthese erfolgt aber nur, solange sich die Myoblasten noch in der proliferativen Phase befinden. Muskelzellen in späteren Entwicklungsstadien, d.h. postmitotische Myoblasten und Myotuben, synthetisieren diese Proteine nicht, oder zumindest in nicht mehr analytisch nachweisbaren Mengen.

Eine besondere Rolle spielen Muskelfibroblasten bei der Ausbildung der muskulären Basalmembran. Von den Fibroblasten synthetisiertes und sekretiertes Laminin und Typ IV Kollagen wird von den Myotuben aufgenommen und in ihre Basalmembran eingebaut. Fehlen die Fibroblasten, wird *in vitro* keine morphologisch vollständige Basallamina gebildet.

Die Proteine der extrazellulären Matrix sind nicht nur für biomechanische Funktionen, sondern auch für die embryo-

nale Differenzierung von Zellen und Organen verantwortlich. Für Replikation, Transskription und Translation *in vitro* müssen sich alle Zellen mit Ausnahme von manchen Tumorzelltypen und Chondrocyten an eine Matrix anheften. Bei Epithelzellen geschieht dies über Laminin, während sich mesenchymale Zellen meist über Fibronektin an die Kollagenmatrix binden. Die Myoblasten verfügen über mehrere, voneinander unabhängige Adhäsionsmechanismen. Während der Proliferationsphase heften sie sich mit Hilfe des Fibronektins an die interstitiellen Kollagene Typ I, III und V. Eine direkte Bindung an die Kollagene des Endomysiums ist offensichtlich nicht möglich.

Differenzieren die Myoblasten zu postmitotischen Myoblasten oder fusionieren sie zu Myotuben, finden in ihrer unmittelbaren Umgebung erhebliche Veränderungen in der Architektur der ECM statt. Einmal kommt es zu einer Trennung des Typ I- vom Fibronektinnetzwerkes. Zusätzlich verlieren die postmitoischen Myoblasten und die Myotuben ihr oberflächengebundenes Fibronektin. Es ist nicht bekannt, was zu diesen Veränderungen führt. Ein verändertes Synthesemuster an Proteoglykanen und eine Neuorganisation von Rezeptoren auf der Zelloberfläche wären mögliche Erklärungen für die beobachteten Phänomene.

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beginnt zu diesem Zeitpunkt die Fusion der Myoblasten zu Myotuben und daran anschließend die Ausbildung einer Basalmembran. Für den Fusionsprozeß müssen sich fusionsfähige Zellen zum einen

erkennen, zum anderen muß ein enger Kontakt zwischen den postmitotischen Myoblasten hergestellt werden. Meine Befunde deuten darauf hin, daß bestimmte Matrixproteine der Basalmembran bei Zellerkennungs- und Zelladhäsionsprozessen eine entscheidende Rolle spielen. Muskelzellen zeigen eine besondere Affinität zum Typ IV Kollagen, dem wichtigsten Bausteinen dieser Membran, die durch Laminin noch verstärkt wird. Zusätzlich wird Laminin von Myoblasten rasch gebunden. Wurden Myoblasten auf einer Kombination der beiden Basalmembrankomponenten kultiviert, konnte man zunächst eine Separation von den Fibroblasten erkennen, die auf anderen Substraten nicht erfolgte. Während der anschließenden Kultivationsperiode erfolgte eine raschere und vollständigere Fusion der Myoblasten, die weder auf den interstitiellen Kollagenen mit Laminin, noch auf Typ IV Kollagen in Gegenwart von Fibronektin zu beobachten war.

Damit Myoblasten mit der ECM in Wechselwirkung treten und auf Veränderungen in der Zusammensetzung der Matrix reagieren zu können, benötigen sie spezifische Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Einer dieser Matrixrezeptoren wurde im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert. Bei dem untersuchten Protein handelt es sich um ein Oberflächenprotein von Muskelzellmembranen, daß für die Bindung der Myoblasten an Laminin, und damit an die Basalmembran, verantwortlich ist. Es besitzt ein Molekulargewicht von 68 000, hat hydrophoben Charakter und behält seine spezifischen Bindungseigenschaften gegenüber Laminin auch im isolierten Zustand bei. Diese Protein ist jedoch kein

muskelspezifisches Membranprotein. Mit Hilfe von Antikörpern konnte der Lamininrezeptor oder ein mit ihm immunologisch verwandtes Protein auch in Membranen anderer Zelltypen nachgewiesen werden.

Die hier dargestellten Befunde über die Interaktion von Muskelzellen mit bestimmten Strukturproteinen der extrazellulären Matrix, die beobachteten Auswirkungen dieser Wechselwirkungen auf die Zelldifferenzierung, und die Isolierung eines für die Interaktion verantwortlichen Rezeptors bieten neue Möglichkeiten, die Entwicklung von Muskelzellen in Zukunft auch auf molekularer Ebene zu untersuchen. Es ist zu hoffen, daß die Aufklärung der bei diesen Interaktionen ablaufenden molekularen Mechanismen helfen wird, den Einfluß der ECM auf die Differenzierung von Zellen besser zu verstehen.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Material

Sämtliche aufgeführten Chemikalien in p.a.-Qualität stammen, wenn nicht anders aufgeführt, von der Fa. Merck, Darmstadt. Alle Angaben in Gramm beziehen sich auf 1000 ml H_2O dest.. Sofern nicht anders angegeben, waren alle Lösungen, die Inhibitoren enthielten, mit PMFS (50 µg/ml), NEM (50 µg/ml) und EDTA (0.015 M) versetzt.

1.1 Zellkultur

PBS-: 8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH_2PO_4, 1.15 g Na_2HPO_4, pH 7.4.

PBS+: Wie PBS-, zusätzlich 0.1 g $CaCl_2$, 0.1 g $MgCl_2 \times 6H_2O$.

CMFS: 8.0 g NaCl, 0.4 g KCl, 1.25 g Na_2HPO_4, 0.2 g KH_2PO_4, 1 g Glucose, pH 7.35.

Versen: wie PBS-, zusätzlich 0.2 g EDTA.

Einfriermedium: DMEM mit 30 % HS und 7.5 % DMSO.

Extraktionspuffer für Zellen: 0.05 M Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.4; Inhibitoren.

Trypsinlösung: wie PBS-, mit 0.25 % Trypsin.

Kollagenaselösung: wie CMFS, mit 1 mg/ml Rohkollagenase.

Dispaselösung: wie CMFS, mit 0.1-0.2 mg/ml Dispase II.

1.2 Biochemie

DEAE-Puffer (Typ V Kollagen): 0.05 M Tris-HCl, 0.02 M NaCl, 2 M Harnsoff, pH 7.4.

DEAE-Puffer (Typ V-Prokollagen): wie für Typ V Kollagen

DEAE-Puffer (Laminin und Typ IV Kollagen): 0.05 M Tris-HCl, 0.25 M NaCl, 2 M Harnstoff, pH 8.6; sowie gleicher Puffer ohne NaCl.

Agarosepuffer: 1 M $CaCl_2$, 0.05 M Tris-HCl, 0.01 % NaN_3.

CMC-Puffer: 0.02 M K-Acetat, 1 M Harnstoff, pH 4.8.

EHS-Waschpuffer: 3.4 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, Inhibitoren.

Kopplungspuffer: 0.05 M NaH_2PO_4, 0.3 M NaCl, pH 7.2.

A-Puffer (7S Kollagen): 0.2 M NaCl, 0.03 M Tris-HCl, 2 M Harnstoff, pH 8.4.

G-Puffer (Fibronektin): 0.05 M Tris-HCl, 0.005 M Benzamidin, 0.02 % NaN_3.

LA6c-Puffer (Fibronektin): 0.05 M Tris-HCl, 1 M KBr, 0.025 M 6-Aminohexansäure, pH 5.3.

NET-Puffer: 0.05 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, 0.5 % NP-40. pH 7.2.

Acrylamidlösung (Laemmli, 1970): 300 g Acrylamid, 8 g N,N-Methylendiacrylamid, 5 % TEMED.

Laufpuffer (Laemmli, 1970): 0.025 M Tris-HCl, 0.192 M Glycin, 0.1 % SDS, pH 8.2).

Gelpuffer (Obergel): 1 M Tris-HCl, pH 6.8; (Trenngel): 1 M Tris-HCl, pH 8.8.

Probenpuffer (Laemmli, 1970): 0.043 M Tris-HCl, 2 % SDS, 6.67 % Glycerin, 0.01 % Bromphenolblau, pH 6.8.

Coomassie Blue Färbelösung: 0.25 % Coomassie Blue brilliant, 25 % Methanol, 7 % Essigsäure, 5 % TCA.

Coomassie Blue Entfärbelösung: 25 % Methanol, 7 % Essigsäure.

Alkalische $AgNO_3$-Lösung: 20 % $AgNO_3$, 0.07 % NaOH, 1.4 ml 25 % NH_3 (100 ml Lösung).

Reduzierlösung: 10 % Methanol, 0.001 % Citronensäure, 0.5 ml/1000 ml 37 % Formaldehyd.

1.3 Immunologie

Phosphatpuffer: 0.05 M NaH_2PO_4/K_2HPO_4, 0.15 M NaCl, pH 7.2.

ELISA-Beschichtungspuffer: 0.007 M KH_2PO_4, 0.007 M Na-Acetat, 0.17 M NaCl, pH 7.5.

ELISA-Substratlösung: 0.8 g 5-Aminosalicylsäure, 0.005 % H_2O_2, pH 6.0.

Phosphatpuffer (F_{ab}-Fragmente): 0.0026 M KCl, 0.0015 M KH_2PO_4, 0.001 M Na_2HPO_4, 0.14 M NaCl, pH 7.4.

AB-Puffer: 0.14 M NaCl, 0.1 % NaN_3.

TBS: 0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, 0.2 g NaN_3, pH 7.5.

Puffer (Western Blot): 0.025 M Tris-HCl, 0.192 M Glycin, 30 % Methanol, pH 8.3.

Cacodylatpuffer (Western Blot): 0.1 M Cacodylsäure, 1.0 mg/ml Brenzkatechin, 1.0 mg/ml 1,4-Phenylendiamin, pH 6.0.

Cacodylatpuffer (Elektronenmikroskopie): 0.05 M Cacodylsäure, 1.72 % Sucrose (w/v), pH 7.4.

FITC- und Rhodamin-Fluoreszenzantikörper: (sheep anti

rabbit)-, (rabbit anti goat)-, (rabbit anti guinea pig)-, (goat anti rabbit)-, (goat anti guinea pig)- globulin conjugate (Miles, Behringwerke oder Dynatech).
Peroxydase gekoppelte Antikörper: (goat anti rabbit)- und (rabbit ant goat)- Conjugate

1.4 Säulenmaterial

DEAE-Zellulose: Whatman DE 52
Caboxymethylcellulose: CM 52 (Whatman)
Biogel A 0.5; A 1.5; A 5; (BioRad lab.)

1.5 Enzyme

Trypsin: 1:250 (Seromed)
Rohkollagenase: CLS II (Boehringer)
Reinstkollagenase: 2000-3000 U/mg (Advance Biofactor, CLS III)
Pepsin: 30 Anson/mg (Sigma)
V8-Protease: 510 U/mg (Miles)
Dispase II: 0.5 U/mg (Boehringer)

1.6 Geräte

Aminosäure-Analysator: Beckmann, Modell Durrum; Autoklav: MPA 111 (Fedegari); CO_2-Inkubator: Modell 3028 und 3157 (Forma Scientific); Cryotom: SLEE; Elektrophorese-Netzgerät 500/500: Desaga; Fluoreszenzmikroskop mit Auflichtkondensor IV F/ und FITC/Rhodamin- Filterkombination: Zeiss; Flüssigkeitsszintillationszähler LS 250 und LS 330

(Beckman), γ-Counter: Gamma 3000 und Gamma 4000 (Beckman); Fraktionssammler: RediRac (LKB) und ISCO; Gelelktrophoreseapparaturen: LKB und Geräte der Technische Werkstatt, MPI; Gel-Slicer: Mickle; Invertoskop mit Photoeinrichtung: Zeiss; Kühlmantelsäulen: Technische Werkstatt, MPI; Lyophilisatoren: Delta, Edwards und Christ; Photometer für ELISA-Platten: Multiscan (Titertek); Recorder: Recorder 1100: W+W (Kontron), 2066 Zweikanalschreiber; Schlauchpumpen: Varioperpex II, 10200 (LKB); Speed Vac Concentrator: Servant; Spektralphotometer: CE 212 (Cecil), DB (Beckman), 2089 Uvicord III und 8300 Uvicord II (LKB), UV 25 + Schreiber (Beckman); Wasserbäder: Julabo SW 1 und U 3, RC-20 (MGW Landa); Zentrifugen: L2, L5 und L8 (Beckman), RC-2 (Sorval), G50K (WKF), TJ-6 und J6-B (Beckman), Labofuge 6000 (Heraeus);

2. Zellkulturen

Für Zellkulturen wurden befruchtete Hühner- und Wachteleier von der Brüterei Hölzl (Moosburg) bezogen. Mäuse der Stämme Balb C und C 57_{Bl} stammen aus der eigenen Zucht des MPI Martinsried. Das Material für Humanzellen wurde von der Firma Seromed (München) erhalten, die L6-Muskelzellinie von Dr. Ringertz (Stockholm, Karolinska Institut, Stockholm).

Alle Primärmuskelzellen wurden auf kollagenbeschichteten Petrischalen gezüchtet (Konigsberg, 1963). Es wurden 50 μl

einer 1 %igen Huhn- oder Rattenkollagenlösung (Typ I) auf den Schalen verstrichen, getrocknet und anschließend im UV sterilisiert.

Das Kulturmedium war Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) oder Ham's F 12 Medium. Alle Medien enthielten 100 U/ml Penicillin-Streptomycin, 100 µg/ml Natriumascorbat sowie verschiedene Mengen an foetalem Kälberserum (FCS) und Pferdeserum (HS) (beide von Seromed oder Gibco) sowie Embryoextrakt (EE).

Im einzelnen verwendet wurden für:
Wachtel- und Hühnermyoblasten: DMEM mit 15% HS, 5% EE
Mausmyoblasten: DMEM mit 20% HS, 2% EE
Humanmyoblasten: DMEM mit 15% FCS, 3% EE, 3 mM $CaCl_2$ und 2 mM Glucose
L6-Myoblasten: DMEM mit 10% FCS
Fibroblasten: Ham's F 12 mit 10% (FCS)

Für Zellen in klonalen Dichten wurde das Pferdeserum auf 20-30% erhöht, um ein rasches Wachstum zu erhalten. Gute Fusionsraten waren durch Reduzierung des Serumgehaltes auf die Hälfte erreichbar.

Kriterium für die Auswahl der Seren war das Wachstumsverhalten der Muskelzellen in Klonkulturen. Während sich bei hohen Zelldichten kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Serumchargen zeigten, fanden sich unter 15 getesteten Seren nur 4, die auch bei niedrigen Zelldichten gutes Wachstum und normale Fusion der Muskelzellen erlaubten. Zwei der vier

benutzten Pferdeseren mußten vor Gebrauch hitzeinaktiviert werden (30 min, 58 ^{o}C).

Der Embryoextrakt wurde nach Coon (1966) aus 9 Tage alten Hühnerembryonen hergestellt. Hierzu wurden 50 Embryonen in 500 ml DMEM homogenisiert und das Gewebe abzentrifugiert. Der erhaltene Übestand wurde entweder 60 min bei 50 000 xg zentrifugiert oder mit Hyaluronidase (1 mg pro 100 ml) behandelt, um die Sterilfiltration des Mediums zu erleichtern.

Medien mit Seren wurden zunächst durch 3.0 µm, 0.45 µm und 0.2 µm Filter unsteril vorfiltriert. Die Sterilfiltration erfolgte mit einer autoklavierbaren Filterpatrone (Sartorius) mit einem 0.2 µm Filter.

2.1 Wachtel- und Hühnermuskelzellen

Der isolierte Brustmuskel von 9-11 Tage alten Embryonen (Lipton, 1977a) wurde in ca. 1 mm große Stückchen geschnitten und für 30 s heftig gevortext (Caplan, 1976). Die erhaltene Zellsuspension wurde durch 2 Lagen von 20 µm Nylonfilter und durch eine Lage optisches Linsenpapier filtriert und die Zellen in Dichten von $2x10^{4}$ pro cm^{2} (Massenkulturen) bzw. 1-10 pro cm^{2} (Klonkulturen) ausgesät. Für einige Experimente wurden die Zellen nach 1-2 Tagen mit 0.01 % Trypsin-0.01 % EDTA oder 0.4U/ml Dispase II (Boeringer) passagiert.

2.2 Mausskelettmuskelzellen

Die hinteren Extremitäten von 18-20 Tage alten Mäuseembryonen wurden unter sterilen Bedingungen abgetrennt. Nach Abziehen der Haut und der oberflächlichen Muskelfascien wurde die Muskulatur herausgeschnitten und in Calzium-Magnesium-freier Saline (CMFS) mit dem Skalpell zerfasert. Die Dissoziation des Gewebes in CMFS erfolgte unter Schütteln mit 1 % Kollagenase (Worthington, CLS II) und 0.1 % Dispase II oder einem Gemisch aus 1 % Kollagenase und 0.25% Trypsin (Boehringer) während 15-25 min bei 37 ^{o}C.

Die Zellsuspension wurde 2 mal mit serumfreiem Medium (DMEM) gewaschen, in Dichten von $2x10^{6}$ Zellen pro 10 cm Schale auf unbeschichtete Falcon Zellkulturschalen ausgesät und bei 37 ^{o}C in 5% CO_2 Atmosphäre inkubiert. Abhängig von den Dissiziationsbedingungen setzte sich nach 30 bis 120 min ein großer Teil der Fibroblasten auf den unbeschichteten Schalen ab, während die Myoblasten im Überstand verblieben. Die nicht angehafteten Zellen wurden von den Schalen abgenommen, mit einem gleichen Volumen DMEM, 30% FCS, 2% EE versetzt und auf mit Ratten Typ I Kollagen beschichtete Zellkulturschalen ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 5-6 h, die weiteren dann alle 2-3 Tage.
Die Fibroblasten wurden mit F 12 Medium, 10% FCS versetzt und für Untersuchungen an Muskelfibroblasten weiterkultiviert.

Nach 2-3 Tagen nahmen die Myoblasten die für Muskelzellen charakteristische, spindelförmige Morphologie an. Zur

weiteren Reinigung wurden die Kulturen für einige Minuten mit 0.2-0.4 U/ml Dispase II bei 37 °C inkubiert. Unter diesen Bedingungen lösten sich die Muskelzellen schneller vom Substrat ab, als die Fibroblasten und konnten durch leichtes Schütteln selektiv abgetrennt werden. Die Zellen wurden zentrifugiert, mit Wachstumsmedium (20% HS, 1 % EE) 2 mal gewaschen und erneut auf kollagenbeschichtete Schalen ausgesät. Nach 3-5 Tagen befanden sich in diesen Kulturen überwiegend spindelförmige, fusionsfähige Myoblasten. Bei Bedarf wurde der letzte Reinigungsschritt ein zweites oder drittes Mal wiederholt.

2.3 L6-Muskelzellen

Bei den L6-Y1 Muskelzellen handelte es sich um Zellen einer permanenten Zellinie (Yaffe, 1968) aus dem Skelettmuskel der Ratte.

2.4 Muskelzellen aus humanem Gewebe

Die Oberschenkelmuskulatur von 8-14 Wochen alten Foeten wurde herausgetrennt, in kleinere Stücke zerfasert und mit Kollagenase/Dispase (0.1 %/0.2 U/ml) 20 min bei 37 °C dissoziert. Die erhaltene Zellsuspension wurde mit serumhaltigem Medium versetzt und direkt auf kollagenbeschichtete Schalen überführt. Die Dissoziationsbedingungen sind für Humangewebe relativ mild, haben aber den Vorteil, daß überwiegend Myoblasten und nur wenige Fibroblasten aus dem Gewebsverband herausgelöst werden (Konigsberg, pers.

Mitt.).

2.5 Mausmuskelfibroblasten

Für Experimente mit Muskelfibroblasten wurden die Zellen verwendet, die sich bei der Vorreinigung der Myoblasten in serumfreiem Medium auf den Plastikschalen abgesetzt hatten. Die Zellen wurden in relativ hohen Dichten ($0.5-2 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm Schale) in F 12 Medium kultviert, und zeigten weder in diesem, noch in von Myoblasten konditioniertem Medium eine Tendenz zur Fusion (White et al., 1975). Verwendet wurden die Zellen in der 2. oder 3. Passage.

2.6 Humanmuskelfibroblasten

Die verwendeten Zellen stammen aus Muskelzellpräparationen, in denen die Muskulatur nicht mit der schonenden Kollagenase/Dispase Methode, sondern mit Typsin dissoziert wurde. Wie bei den Mausfibroblasten handelt es sich um die bei der Vorreinigung auf Plastikschalen abgesetzten Zellen. Ihre Kultivation erfolgte wie unter 2.5 beschrieben.

2.7 Humanhautfibroblasten

Haut von 8-14 Wochen alten Foeten wurde nach zweistündiger Inkubation bei 4 ^{o}C in Penizillin-Streptomycin haltiger PBS Lösung in kleine, ca. 2-4 mm^2 große Stückchen zerschnitten und in unbeschichtete Falconschalen überführt. Aus den auf den Schalen abgesetzten Gewebsstückchen begannen

die Zellen nach 1-2 Tagen auszuwachsen. Konfluente Kulturen wurden mit 0.25% Trypsin 0.04% EDTA in CMFS passagiert. Nicht benötigte Zellen einer jeden Passage wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3. Attachmentassays

3.1 Vorbereitung der Platten

Die meisten Bindungsversuche wurden in Microtiterplatten der Firma Falcon durchgeführt. 50 µl mit 5-10 µg Kollagen, Laminin oder Fibronektin in 0.1 N Essigsäure wurden in jedes Loch pipettiert, und die Lösung eingetrocknet. Derartig vorbereitete Schalen wurden nach Möglichkeit sofort verwendet, oder maximal 2-3 Tage bei -16 °C trocken aufbewahrt.

Vor Beginn des Tests wurden die Platten 3 mal mit Medium (DMEM) ohne Serum und EE gewaschen und anschließend 1-2 h bei 37 °C mit je 100 µl DMEM + Protein inkubiert. Als Proteine wurden verwendet: DMEM/Laminin (25 µg/ml), DMEM/Fibronektin (25 µg/ml), DMEM/FCS (10% V/V), DMEM/HS (10% V/V) und DMEM/HS+EE (10%+5% V/V). Als Kontrollen wurden einige Löcher mit DMEM ohne Zusätze, sowie unbeschichtete Löcher mit DMEM und den Proteinen inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die nicht gebundenen Proteine durch dreimaliges Waschen mit DMEM entfernt und die Zellen ausgesät.

Für Inhibitionstests wurden die Platten nach Entfernen

der ungebundenen Proteine mit je 100 µl Antikörperlösung (30 µg Antiserum pro ml DMEM) 60 min bei 37 °C inkubiert. Bei einem Teil der Versuche wurden die ungebundenen Antikörper gegen Laminin und Fibronektin vor der Zellzugabe durch Waschen mit Medium entfernt, bei anderen verblieben sie während der gesamten Testdauer auf den Schalen.

Wurden die Zellen auch nach den Bindungsversuchen benötigt, erfolgte der Test auf Petrischalen. Die 6 cm-Schalen wurden mit je 50 µg Protein beschichtet, indem die Proteinlösung als dünner Film ausgestrichen und anschließend an der Luft getrocknet wurde. Die Sterilisation der Schalen erfolgte im UV.

3.2 Vorbereitung der Zellen

Für die Attachmentversuche wurden Wachtel- und Mausmyoblasten sowie L6-Zellen verwendet. Die Primärzellen wurden als Massenklonkulturen angelegt und wie unter 1.2 beschrieben gereinigt. Die L6-Zellen wurde in der 2. oder 3. Passage nach dem Auftauen der Stammpopulation eingesetzt.

Um die Empfindlichkeit des Tests zu erhöhen, wurden die Zellen mit ^{51}Cr als Natriumchromat oder ^{75}Se-Methionin radioaktiv markiert. Die Markierung mit Chrom erfolgte während einer einstündigen Erhohlungsphase der Zellen nach der Trypsinierung kurz vor dem Bindungstest. Etwa 0.025-0.5 cpm je Zelle wurden aufgenommen.
Ein höherer Einbau von Radioaktivität (2-4cpm/Zelle) wurde durch eine 12 stündige Inkubation der Zellen mit

Seleno-Methionin erreicht. In beiden Fällen erfolgte die Markierung durch Zugabe von 100 µCi in 2 ml DMEM, das bei der Langzeitinkubation (12 h) 2% Serum enthielt.

Im Anschluß an die Markierung wurden die Zellen mit 0.1 % Trypsin von den Schalen abgelöst.Hierdurch wurden gleichzeitig die Oberflächenproteine der Myoblasten durch die Enzymbehandlung entfernt.Die Zellen wurden anschließend von der nicht inkorporierten Radioaktivität freigewaschen und nach einer 30 minütigen Erholungsphase auf die wie in 3.1 vorbehandelten Platten ausgesät.

3.3 Durchführung des Bindungstests

Die markierten Zellen wurden so verdünnt, daß die Suspension etwa 5-20 x 10^4 cpm pro ml Medium enthielt. In jedes Loch wurden 100 µl der Zellsuspension mit 5-20 x 10^3 cpm (10^3-10^4 Zellen) gegeben. Zu den angegebenen Meßzeiten wurden die nicht angehefteten Zellen im Überstand mit einer Titertek Mehrfachpipette abgenommen, und die Löcher 2 mal mit DMEM gewaschen. Die Waschlösungen und der Überstand jedes Meßpunktes wurde gesammelt.
Die abgesetzten Zellen wurden mit einer 37 ^{o}C warmen Lösung mit 3% SDS und 1 % NP 40 lysiert, und die freigesetzte Radioaktivität zusammen mit den zwei folgenden Waschlösungen vereinigt und die Proben im γ-Counter gezählt.

Für die Auswertung des Versuchs wurde die Radioaktivität im Überstand und im Lysat jedes einzelnen Loches getrennt bestimmt. Der Prozentsatz der abgesetzten Zellen wurde

berechnet nach:

$$\% \text{ Attachment} = \frac{\text{cpm (Lysat)}}{\text{cpm (Lysat)} + \text{cpm (Überstand)}}$$

Um Verfälschungen der Meßergebnisse durch eine eventuelle Freisetzung von Radioaktivität aus den Zellen in der Berechnung berücksichtigen zu können, wurde bei jedem Versuch eine Spontanrelease Kontrolle durchgeführt. Hierfür wurden zu bestimmten Meßzeiten über den gesamten Meßbereich hinweg 1 ml-Proben der Ausgangszellsuspension abzentrifugiert, mehrmals gewaschen und die Radioaktivität im Zellayer und im Waschpuffer bestimmt. Die Messung erfolgte in Duplikaten.

Verschiedentlich wurden nicht die Substrate, sondern die Zellen mit Laminin und Fibronektin inkubiert und auf reine Kollagensubstrate ausgesät. Die Inkubation erfolgte mit den entsprechenden Proteinen während der Erholungsphase der Zellen nach der Trypsinierung. Freies Protein wurde durch eine Waschzentrifugation abgetrennt. Die Auswertung dieser Studien erfolgte nach der oben beschriebenen Methode.

In Fällen, in denen die Zellen im Anschluß an die Bindungsstudien weiter kultiviert und untersucht werden sollten, wurden unmarkierte Zellen verwendet. Die gesamte Vorbehandlung der Zellen geschah, wie bereits beschrieben, allerdings unter sterilen Bedingungen. Der Test wurde in vorbeschichteten Petrischalen durchgeführt. Die nicht

abgesetzten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen zusammen mit dem Waschmedium in andere Petrischalen überführt und alle Zellen mit serumhaltigen Medien weiterkultiviert. Die Auswertung dieser Attachmentassays erfolgte durch Auszählen von 10 oder 20 Gesichtsfeldern im Lichtmikroskop.

4. Nachweis und Charakterisierung von Proteinen

4.1 Radioaktive Markierung von Zellkulturen

Als Markierungsmedien wurden DMEM oder F 12 mit 1 % Serum (FCS oder HS) verwendet, die im Falle des Kollagennachweises 50 µg/ml β-Aminoproprionitril enthielten. Als radioaktive Marker wurden 2.5 µCi/ml ^{14}C-Glycin (113 mCi/mmol) bzw. L-(U-^{14}C)-Prolin und 25 µCi/ml L-(2,3-^{3}H)-Prolin (35 Ci/mmol) verwendet. Die Markierungsdauer betrug bei Massenklon- und Massenkulturen 24 h mit 3-5 ml Inkubationsmedium pro 10 cm Schale.

Die markierten Medien wurden gesammelt, mit Inhibitoren 0.01 M N-Äthylmaleimid (NEM), 0.005 M Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) sowie 0.015 M EDTA versetzt und, sofern nicht umgehend aufgearbeitet, bei -20 °C eingefroren. Die Zellschichten wurden mit PBS gewaschen und in einer Extraktionslösung (0.05 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 M NaCl und Inhibitoren) mit einem Glashomogenisator homogenisiert. Nach Entfernen des Zellpellets durch Zentrifugation erfolgte die

weitere Aufarbeitung der Zellextrakte wie die der Medien. Mit Plastikringen umgebene Einzelzellklone wurden mit 5 µCi ^{14}C-Glycin in 50 µl Inkubationsmedium 24 h inkubiert. Das Medium wurde anschließend abgesaugt und gesammelt, die Zellen durch Zugabe von H_2O hydrolysiert und das Hydrolysat nach Zugabe von Inhibitoren mit dem Medium zusammen verarbeitet.

4.2 Pepsinabbau

Die Proben wurden mit Eisessig auf 0.5 M Essigsäure gebracht und der pH mit 6 N HCl auf 2.0 eingestellt. Der Abbau erfolgte mit Pepsin (0.1 mg/ml) für 12 h bei 15 °C bzw. 24 h bei 4 °C. Die Reaktion wurde durch Einstellung des pH auf 8.5 mit 6 N NaOH gestoppt. Für die SDS-Gelelektrophorese wurde ein Teil des Materials gegen H_2O dialysiert und lyophilisiert, der Rest eingefroren.

4.3 Kollagenaseabbau

Der Abbau erfolgte mit Reinstkollagenase (Advanced Biofactures, Form III) in 0.025 M Tris, pH 7.4, 0.001 M $CaCl_2$ für 3-4 h bei 37 °C. Beendet wurde der Abbau durch 15 minütiges Erhitzen der Probe auf 60 °C und anschließende Dialyse gegen H_2O. Die lyophilisierten Proben wurden für die SDS-Gelelektrophorese verwendet.

4.4 V8-Proteasespaltung

Die lyophilisierten Proben wurden in 0.4 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl pH 7.4 gelöst und 6 h mit 0.1mg/ml V8-Protease (Miles) bei 30 °C inkubiert. Nach Dialyse und Lyophilisation wurden die Proben in SDS-Pobenpuffer aufgenommen.

4.5 Bromcyanabbau

Die lyophilisierten Proben wurden in 70 %iger Ameisensäure für 30 min bei 45 °C denaturiert und unter Stickstoffatmosphäre mit 15 mg Bromcyan pro mg Protein 4 h bei 30 °C gespalten (Epstein, 1971). BrCN und Ameisensäure wurden anschließend durch Lyophilisation in einer Vakuumzentrifuge (Servant) entfernt.

4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der Nachweis markierter und unmarkierter Proteine erfolgte durch Plattengelelektrophorese (Laemmli, 1970), routinemäßig auf 5 oder 6 %igen Trenngelen. Lediglich für BrCN- und V8-Protease gespaltenes Material wurde die Gelkonzentration auf 12 % erhöht. Sämtliche Gele in Zusammenhang mit Membranisolierungen und der Reinigung von Matrixrezeptoren waren 5-18 %ige lineare Gradientengele. Die Obergelkonzentration betrug in allen Fällen 3 %, die Konzentration an Bis-Acrylamid 0.8 % bezogen auf Acrylamid.

Die lyophilisierten Proben wurden in Probenpuffer (0.043 M Tris-HCL, pH 6.8, 2 % SDS, 0.01 % Bromphenolblau)

aufgenommen, unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen 30 min bei 60 °C denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Reduktion wurden dem Puffer 10 % β-Mercaptoäthanol oder 0.1 M Dithioerythrit zugesetzt.
Proben die durch Immunpräzipitation mit Pansorbin erhalten worden waren, wurden 3 min bei 100 °C in Probenpuffer erhitzt, das Protein A durch Zentrifugation entfernt und der Überstand auf das Gel aufgetragen.
Die Elektrophoresen wurden mit 100 V gestartet, bis die Proteine das Obergel durchwandert hatten, anschließend bei konstanten 200 V und einer Temperatur von 4 °C fortgesetzt.

4.7 Fluorographie und Densitometrie

Gele mit ^{3}H- und ^{14}C-markierten Proben wurden mit PPO gesättigt, das PPO durch Inkubation mit H_2O im Gel präzipitiert und die Gele auf Filterpapier im Vakuum getrocknet (Bonner und Laskey, 1974). Die Inkubation der getrockneten Gele mit einem Röntgenfilm erfolgte bei -80 °C im Dunkeln. Die Inkubationsdauer wurde so gewählt, daß die Schwärzungsgrade im linearen Empfindlichkeitsbereich der verwendeten Filme lagen. Die Filme wurden durch Vorbelichtung mit einem Elektronenblitz sensibilisiert (Laskey und Mills, 1975).
Die relativen Verhältnisse einzelner Banden zueinander wurde durch densitometrische Auswertung mit einem Microdensitometer (Joyce-Loebel) ermittelt. In einigen Fällen wurden auch nichtgetrocknete, radioaktive Gele in Richtung ihrer Laufstrecke in 0.5 mm große Stückchen geschnitten

(Gel-Slicer) und die Radioaktivität im β- bzw. γ-Counter bestimmt.

4.8 Lokalisierung nichtradioaktiver Gelbanden

Für Routinezwecke wie z.B. Lokalisierung von Proteinstandards wurden die Proben mit Coomassie Blue oder Amidoschwarz gefärbt. Zur Überprüfung der Reinheit isolierter Proteine wurde die Silbermethode von (Oakley et al., 1980) leicht modifiziert. Diese Färbemethode ist etwa 100 mal empfindlicher als die Coomassie Blue Färbung und erreicht die Sensitivität radioaktiver Gele. Mit ihr können Proteine in Mengen von 50-100 ng pro Bande nachgewiesen werden und sie war somit die Methode der Wahl für die Analytik von Membranpräparationen.

Die Gele wurden 30 min mit 10% Glutaraldehyd fixiert, intensiv 6-12 h zunächst mit H_2O gewaschen, dann mit H_2O unter Zusatz von Dithioerythrit (5 µg/ml) inkubiert. Nach erneutem 15 min Waschen erfolgte für 15 min eine Inkubation mit einer ammoniakalischen Silbernitratlösung. Das Gel wurde hierauf erneut 5-10 min mit H_2O gespült um das nicht gebundenen Silber zu entfernen, bevor die Banden durch Zugabe einer Reduzierlösung entwickelt wurden.

4.9 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation diente zum Nachweis von Proteinen aus Zellkulturmedium und Zellextrakten. Den Proben wurde BSA zugesetzt (Endkonzentration 0.1 %), anschließend wurden sie

gegen 0.15 M Trispuffer (pH 7.4) und 0.04 % Tween 20 dialysiert und mit 10-15 µg Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen 2 h bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Kaninchen-, Ziegen- oder Meerschweinchenserum als Träger wurde mit einem zweiten Antikörper, einem anti-IgG gegen diejenige Spezies, aus der das erste Antiserum stammte, für 12 h bei 4 °C inkubiert. Das gebildete Präzipitat wurde bei 3000 rpm für 10 min abzentrifugiert, zweimal mit dem für die Präzipitation verwendeten Puffer gewaschen und für die Elektrophorese in SDS-Probenpuffer gelöst.

Zum Nachweis mehrerer Proteine aus Medien oder Extrakten, die wie das Material von Einzelzellklonen nur in geringen Mengen vorhanden waren, wurde die Methode von Kessler (1975; 1976) derart modifiziert, daß aus derselben Probe mehrere Immunpräzipitationen nacheinander durchgeführt werden konnten.

Die Kessler'sche Methode arbeitet nicht mit einem zweiten Antikörper, sondern nutzt die starke Affinität von Protein A aus Staphylococus Aureus Bakterien aus, Antigen-Antikörperkomplexe zu binden. Die zu untersuchenden Proben wurden nach Zugabe von Nonidet-P 40 (NP 40) (Endkonzentration 0.5%) mit 10-15 µl Antiserum inkubiert. Anstelle des zweiten Antikörpers wurde die mit NET-Puffer (0.05 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.2, 0.5% NP 40) gewaschene 10 %ige Bakteriensuspension (Pansorbin, CalBiochem) zugefügt und der Pansorbin/Protein-Immunkomplex nach dreistündiger Inkubation bei RT abzentrifugiert. Freie Antikörper und noch nicht gebundene Antigen-Antikörperkomplexe wurden durch eine

erneute Inkubation mit Pansorbin entfernt, bevor die Immunpräzipitation mit einem weiteren Antikörper erfolgte. Kontaminationen der nachfolgenden Immunpräzipitationen durch die jeweils vorausgegangenen wurde durch die anschließende Analyse der SDS-Gele ausgeschlossen.

Die erhaltenen Bakterien-Immunkomplexe wurden zweimal mit NET-Puffer gewaschen, in 20-25 µl SDS-Probenpuffer für 3 min bei 100 °C erhitzt, abzentrifugiert und der Überstand auf das Gel aufgetragen.

5. Isolierung und Reinigung von Proteinen

Folgende Kollagene wurden mir dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt:
Typ I (Huhn) (v.d. Mark et al., 1976a,b), Typ III (Huhn) (Herrmann et al., 1980), Typ I und III (Ratte) (Mollenhauer), säurelösliches Typ IV und 7S (Maus) (Timpl et al., 1978a,b) und 7S-short (Human) von T. Voss.

Isoliert und gereinigt wurden Typ V Kollagen aus Hühnerhaut, Typ IV Kollagen und Laminin aus dem EHS-Maustumor, Typ IV- und 7S Kollagen aus humaner Plazenta und Fibronektin aus Humanserum.

5.1 Typ V Kollagen

Die Typ V Präparation erfolgte aus der Haut von ausgewachsenen Hühnern. Nach Entfernen von Fett- und

Gewebsresten wurde das Material in 0.5 M Essigsäure (pH mit HCL auf 2.5) mit 0.5 mg Pepsin pro Gramm Gewebe bei 4 °C extrahiert. Das Pellet wurde abzentrifugiert und das Typ V Kollagen aus dem Überstand durch fraktionierte Salzfällung von den anderen Kollagenen abgetrennt. Die Reinigung des Präzipitats erfolgte durch CM- und DEAE-Chromatographie (v.d. Mark und v.d. Mark, 1979).

5.2 Fibronektin

Die Reinigung des Fibronektins erfolgte durch Affinitätschromatographie an einer Gelatinesepharose (Dessau et al., 1978a) nach einer von Richter (pers. Mitt.) modifizierten Methode. Humanes Serum wurde mit Benzamidin (0.38 g/500 ml Serum) und Trasylol (2,5 ml/500 ml Serum) versetzt, 1 h bei 25 °C geschüttelt und anschließend 1 h bei 9000 rpm (Beckmann, Rotor 19) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit G-Puffer (0.05 M Tris-HCl pH 7.5, 0.005 M Benzamidin, 0.02 % Natriumazid) äquilibrierten Gelatinesepharosesäule aufgetragen, mit G-Puffer gewaschen und daraufhin mit G-Puffer, 1 M NaCl gespült. Im Anschluß hieran wurde zunächst mit 0.2 M Arginin in 0.05 M Tris-HCl pH 7.5, 0.02 % Natriumazid, dann erneut mit obigem Trispuffer ohne Arginin gewaschen. Das noch gebundene Fibronektin wurde mit LA6c-Puffer (0.05 M Tris-HCl pH 5.3, 1 M Kaliumbromid, 0.025 M 6-Aminohexansäure) eluiert, gegen den gewünschten Puffer dialysiert und bei -20 °C aufbewahrt.

5.3 7S (long) aus Plazenta

Humane Plazenta wurde mit 0.5 M Natriumacetat gewaschen und anschließend im vierfachen Volumen 0.5 M Essigsaure aufgenommen. Der Pepsinabbau (0.5 mg Pepsin pro mg Gewebe) erfolgte für 12 h bei 4 °C. Das Pellet wurde abzentrifugiert, in 0.5 M Essigsaure aufgenommen, unter Ruhren resuspendiert und erneut zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereinigt, die NaCl Konzentration auf 6 % NaCl erhöht und die gefällten Kollagene abgetrennt.
Das Prazipitat wurde in 0.2 M NaCl, 0.03 M Tris-HCl pH 7.6 gelöst, der pH mit NaOH nachgestellt und über Nacht gegen den gleichen Puffer dialysiert. Unlosliches Material wurde abzentrifugiert und das Typ IV Kollagen mit 1.8 M NaCl präzipitiert. Das ausgefällte Typ IV wurde erneut in obigem Puffer gelöst und die Fällung mit 1.7 M NaCl wiederholt. Anschließend wurde das Protein gegen A-Puffer (0.2 M NaCl, 0.03 M Tris-HCl, 2 M Harnstoff, pH 8.4) dialysiert mit DEAE-Zellulose im Batch-Verfahren gerührt und nach Versetzen mit 1 M NaCl zentrifugiert.

Nach Dialyse des erhaltenen Überstandes gegen 0.03 M Tris-HCl mit 0.05 mmol $CaCl_2$ wurde das Typ IV Kollagen mit Kollagenase (Worthington) versetzt (1:200) und 24 h bei 25 °C abgebaut. Der Ansatz wurde mit Essigsäure auf pH 4 angesäuert und gegen 0.1 M Essigsaure salzfrei dialysiert. Die weitere Reinigung erfolgte auf einer Agarose A 5.0 (5 x 125 cm) in 1 M $CaCl_2$, 0.05 M Tris-HCl pH 7.5.

5.4 Laminin aus EHS-Maustumor

Ausgangsmaterial für die Laminin- und auch für die Typ IV Präparation war der EHS Maustumor (Timpl et al., 1979). Zur Kultivierung des Tumors wurde das Material von seiner Bindegewebskapsel befreit, durch eine Spritze gepreßt und die erhaltene Zellsuspension nach Waschen mit steriler PBS-Lösung Mäusen des Stammes C 57_{Bl} subkutan gespritzt. Der Tumor wächst nichtinvasiv unter der Haut und erreicht nach etwa 4-6 Wochen eine Größe von 4-5 Gramm. Für eine Präparation wurde Material von etwa 100 Mäusen (ca. 500 g Gewebe) aufgearbeitet. Alle Puffer enthielten als Inhibitoren 50 µg/ml PMSF und NEM sowie 0.002 M EDTA; die Aufarbeitung erfolgte bei 4 °C.

Der isolierte Tumor wurde zweimal über Nacht mit 3.4 M NaCl in 0.05 M Tris-HCl pH 7.5 gewaschen und das erhaltene Pellet mit 0.5 M NaCl in 0.05 M Tris-HCl pH 7.4 extrahiert. Der Überstand wurde mit NaCl auf eine Salzkonzentration von 1.7 M NaCL gebracht, um eventuelle Verunreinigungen von neutralsalzlöslichem Typ IV Kollagen auszufällen. Das Pellet des 0.5 m NaCl-Extraktes wurde für die Typ IV Kollagen-präparation weiterverwendet.

Der Überstand der 1.7 M NaCl-Fällung wurde anschließend gegen DEAE-Puffer (0.05 M Tris-HCl, 0.25 M NaCl, 2 M Harnstoff, pH 8.6) dialysiert. Unter diesen Bedingungen wurden Typ I Kollagen und Fibronektin an die DEAE-Zellulose gebunden. Laminin und noch verbliebenes Typ IV wurden dann in einem zweiten DEAE-Lauf ohne NaCl voneinander

getrennt.Das Kollagen wurde unter diesen Bedingungen nicht gebunden. das Laminin konnte mittels eines NaCl-Gradienten (0-0.3 M NaCl) eluiert werden.

Die endgültige Reinigung erfolgte auf einer Agarose A 1.5 (3.5 x 160 cm) in 1 M $CaCl_2$, 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5; die Durchflußrate der Säule betrug bei einem Auftragsvolumen von 25-30 ml 25 ml/h. Das erhaltene Laminin wurde gegen TBS-Puffer mit 0.3 M NaCl dialysiert, auf einer Amicon (XM 100) auf 2-0.4 mg/ml konzentriert und bei 4 °C aufbewahrt.

5.5 Typ IV Kollagen aus EHS-Tumor

5.5.1 Säurelösliches Typ IV Kollagen

Das Pellet der 0.5 M NaCl-Extraktion der Lamininpräparation (5.4) wurde in 0.5 M Essigsaure suspendiert und zweimal mit je 1000 ml 0.5 M Essigsäure extrahiert. Beide Extrakte wurden vereinigt, und das säurelösliche Typ IV Kollagen mit 6 M NaCl gefallt.

5.5.2 Pepsinextrahiertes Typ IV Kollagen

Das Pellet des Essigsäureextraktes wurde mit Pepsin (270:1) versetzt, 16 h bei 4 °C abgebaut und mit 6 M NaCl aus dem Überstand des Pepsinabbaus gefällt.

Beide Kollagene wurden anschließend gegen 0.05 M Tris-HCl, 2 M Harnstoff pH 7.5 dialysiert und DEAE-chromatographisch gereinigt (Timpl et al., 1978a,b).

5.6 Typ V Prokollagen

Mit ^{14}C-markiertes Medium von 8-10 Wachtel- oder Hühnermyoblasten Massenkulturschalen wurde gegen DEAE-Puffer (0.05 M Tris-HCl pH 7.5, 0.02 M NaCl, 2 M Harnstoff und Inhibitoren) dialysiert bei 4 °C und auf eine 1.5 x 15 cm große DEAE-Zellulosesaule (Whatman DE 52) aufgetragen. Das ungebundene Material wurde mit 100 ml Puffer aus der Säule gewaschen, die gebundenen Proteine mit einem NaCl-Gradienten (0.02-0.3 M NaCl) eluiert. Anschließend wurde mit 1 M NaCl in DEAE-Puffer nachgewaschen. Die Lokalisierung der Proteine erfolgte durch Bestimmung der Radioaktivität der gesammelten Fraktionen in Szintillationscounter. Die erhaltenen Proteine wurden salzfrei dialysiert, lyophilisiert und auf dem SDS-Gel analysiert.

6. Kopplung von Proteinen an Sepharose

Die Kopplung von Laminin, Fibronektin, Kollagenen und anderen Proteinen an Sepharose 4B (Pharmacia) erfolgte nach Cuatrecasas (1978). 50 ml gewaschener Sepharose 4B wurden bei pH 11.5-12 mit 5 g Bromcyan aktiviert, mit eiskaltem Phosphatpuffer (0.05 M Na-Phosphat, ph 8.0) gewaschen, anschließend mit 50 mg Proteinlosung (0.5-1 mg/ml in Phosphatpuffer) versetzt und 12 h bei 4 °C gerührt. Im Anschluß an die Kopplung wurde die Proteinsepharose zur Inaktivierung noch aktivierter Bindungsstellen mit 0.1 M Glycin in TBS, danach mit 3 M KSCN gewaschen. Aufbewahrt wurden die Proteinsepharosen in TBS oder Tris-Puffer. Sie

wurden zur Kreuz- und Homologabsorption bei der Antikörperreinigung und bei der Affinitätschromatographie der Matrixrezeptoren verwendet.

7. Herstellung und Reinigung von Antikörpern

7.1 Immunisierung

Es wurden Kaninchen, Meerschweinchen und Ziegen immunisiert. Die Kollagene wurden in 0.1 M Essigsäure gelöst; Laminin und Fibronektin in 0.05 M Phosphatpuffer mit 0.3 M NaCl. Im allgemeinen wurden pro Injektion gespritzt bei:

Kaninchen: Typ V Kollagen vom Huhn (2 mg), pepsinextrahiertes Typ IV vom EHS-Maustumor (1 mg), Typ IV- und 7S Kollagen aus humaner Plazenta (je 1 mg), Laminin vom EHS-Maustumor (0.25-0.5 mg), 68K-Protein (Lamininrezeptor) aus Mausmuskulatur (0,1-0,2 mg).

Meerschwein: pepsinextrahiertes Typ IV Kollagen (0.25 mg) und Laminin (0.25 mg), beide EHS-Maustumor.

Ziege: Typ V Kollagen vom Huhn (5 mg) und Laminin vom EHS-Maustumor (0.5-1 mg).

Für subkutane und intradermale Immunisierungen wurden die Proteinlösungen mit dem gleichen Volumen an komplettem Freund'schen Adjuvans (Behringwerke) versetzt und durch Ultraschall homogenisiert. Für intravenose Immunisierungen wurde kein Adjuvans verwendet. Weitere Booster erfolgten in

Abständen von 2 Wochen mit inkomplettem Adjuvans, wobei die Immunisierungsmethode gewechselt wurde.
Für anti-Typ V Kollagen ließen sich höhere Titer erreichen, wenn die erste Injektion direkt in die freipraparierten Lymphknoten erfolgte. In diesem Fall wurden 50 µg Antigen in 50 µl Phosphatpuffer ohne Adjuvans gespritzt.

An nicht selbst hergestellten Antikörpern wurden verwendet: Meerschwein und Kaninchen anti(human)-Fibronektin von W. Dessau, Ziegen anti(Kaninchen)-Fibronektin von Cappels, Kaninchen anti(Huhn bzw. Ratten)-Typ I und III von K. von der Mark, Kaninchen anti(Huhn)-Typ IV von R. Mayne, Kaninchen und Ziegen anti(Maus)-Typ IV- bzw. 7S Kollagen sowie Kaninchen anti(Maus)-Laminin, alle von R. Timpl und Kaninchen anti(Huhn)-α-Aktin von H. Holtzer. Zusätzlich wurden monoklonale Antikörper gegen Maus-Laminin (R. Timpl) und Human-Typ IV Kollagen (D. Hollister) eingesetzt.

7.2 Serologische Testmethoden

7.2.1 Passive Hämagglutination

Humanerythrocyten wurden nach Beil et al. (1972) durch Glutaraldehydkopplung mit Kollagen beladen. Die Erythrocyten wurden 15 min bei RT mit 0.09 % Glutaraldehyd aktiviert und pro ml gepackte Erythrocyten mit 30 mg Kollagen in 20 ml 0.1 M Natriumacetat 1.5 h inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 0.1 M Calciumacetat gefolgt von PBS wurden die Erythrocyten 1.5 h mit 1 % Kaninchennormalserum (KNS) gerührt (20 ml KNS pro ml Sediment). Die Kollagenantiseren

der immunisierten Kaninchen wurden mit behandelten Erythrocyten auf Microtiterplatten in 1 : 1 Verdünnungsschritten auf passive Hämagglutination getestet.

7.2.2 ELISA

Zur Beschichtung der Microtiterplatten wurden verschiedene Antigene in einer Konzentration von 50 µg pro ml (Kollagene I, III, IV, V, 7S und Fibronektin) bzw. 100 µg pro ml (Laminin) in Beschichtungspuffer (0.007 M K_2HPO_4, 0.007 M Essigsäure, 0.17 M NaCl pH 7.5) gelöst, pro Loch 100 µl pipettiert und die Lösungen 48 h bei 4 °C auf den Platten belassen (Gosslau und Barrach, 1979). Sollten Antikörper gegen isolierte Zellmembranen getestet werden, wurden 5 µg der in TEA-Puffer (0.01 M Tris-HCl pH 7.4) mit Ultraschall suspendierte Membranen (50 µg/ml) auf polylysinbeschichtete Platten aufgetrocknet.

Die Platten wurden anschließend mit PBS (1 % BSA) 5 x gewaschen und mit Antikörpern bzw. Antiseren in 1 : 5 Verdünnungsschritten 12 h bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS (5x) wurde zunächst 2 h mit einem peroxidasemarkierten zweiten Antikörper (anti- Kaninchen-, Ziege-, Maus- oder Meerschwein- IgG) bei RT inkubiert, ungebundener Antikörper mit PBS entfernt und jedem Loch 100 µl Substratlösung (80 mg 5-Aminosalicylsäure in 100 ml H_2O, pH 6.0, 0.005 % H_2O_2) zugesetzt (Voller et al., 1976). Nach 2 h wurden 100 µl 1 N NaOH zugegeben und die Farbentwicklung bei 592 nm im automatischen Photometer (Titertek) bestimmt.

7.2.3 Charakterisierung der Antikörper durch Immunfluoreszenz

Zur Überprüfung der Spezifität der Antikörper wurden charakteristische Gewebe wie Augen, Knochen oder Niere angefärbt und auf Kreuzreaktivität mit anderen Antigenen untersucht.

8. Herstellung von F_{ab}-Fragmenten

2 ml Kaninchenserum (anti -Laminin, -Fibronektin, -68K-Protein und Nichtimmunglobulin) wurden gegen 0.02 M Tris-HCl pH 8.0, 0.028 M NaCl dialysiert und auf eine mit gleichem Puffer äquilibrierte Affi-Gel Blue Säule (Biorad) aufgetragen, um Proteasen zu entfernen. Die IgG-Fraktion wurde auf einer Amicon (PM 30) auf das Ausgangsvolumen eingeengt, gegen 0.1 M Natriumacetat, pH 4.3 dialysiert und die Proteinmenge durch Lowry (1951) oder den BioRad Protein Assay ermittelt. Pro 20 mg IgG wurde 1 mg kristallines Pepsin (30 Anson/mg) hinzugefügt und 24 h bei 31 °C inkubiert. Anschließend wurde bei RT 2 h gegen 0.1 M 2-Mercaptoäthanol, dann 3 h gegen 0.1 M Jodacetamid und schließlich intensiv gegen Phosphatpuffer (0.0026 M KCl, 0.0015 M KH_2PO_4, 0.001 M Na_2HPO_4, 0.14 M NaCl, pH 7.4) dialysiert. Die reduzierten und alkylierten IgG-Fragmente wurden dann auf eine mit AB-Puffer (0.14 M Phosphat, 0.1 % Natriumazid, pH 8.0) äquilibrierten Protein-A Sepharosesäule aufgetragen. Die F_{ab}-Fragmente wurden im Durchlauf erhalten, der F_c-Teil des IgG mit 0.3 M Natriumcitrat, pH 3.0 eluiert.

Nach Dialyse gegen AB-Puffer wurden die Proben in einer Vakuumzentrifuge (Speedvac) auf das Ausgangsvolumen eingeengt und gegen TBS oder Zellkulturmedium dialysiert. Die Vollständigkeit des Pepsinabbaus und der Reduktion mit Merkaptoäthanol wurden auf einem 5-18 %igen Gradientengel, die Funktionsfähigkeit der Antikörper im Bindungsassay oder im ELISA mit einem anti-F_{ab} Antikörper überprüft.

9. Immunhistologie

Zur Herstellung der Gefrierschnitte wurden die Gewebe (z.B. Muskulatur, Auge, EHS-Tumor) freipräpariert, mit PBS gewaschen und in Compound (Miles) auf Metallblöcken eingefroren. 6-8 µm dicke Gefrierschnitte wurden auf einem Kryotom (Südwestdeutsche Laboreinrichtung und Elektrotechnik GmbH, Mainz) hergestellt.
Zellkulturen wurden für die intrazelluläre Immunfluoreszenz mit PBS gewaschen, mit 70 %igem, 4 °C kaltem Äthanol fixiert und luftgetrocknet. Für die Lebendfärbung erfolgte die Anfärbung entweder direkt nach dem Waschen oder nach Fixierung mit 1.3 % Paraformaldehyd. In beiden Fällen wurden die Zellen nicht getrocknet.

Die zu färbenden Proben wurden mit 10 µl spezifischer Antikörperlösung bedeckt und 30 min bei RT inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe mit Fluorescein- (FITC) oder Rhodamin-markiertem anti Ziege- (Kaninchen- oder Meerschwein-) IgG (Behringwerke, Verdünnung 1:20) nachgewiesen. Auch die zweite Inkubation erfolgte

30 min bei RT. Nichtgebundener Antikorper wurde mit PBS entfernt, und die Proben mit PBS/Glycerin (9:1) sowie einem Deckglas vor dem Austrocknen geschützt.

Für die Immunfluoreszenz Doppelfärbung (v.d. Mark, 1976) wurden die Proben mit anti-Fibronektin (vom Kaninchen) versetzt, gefolgt von anti-Kaninchen-FITC. Die freien Bindungsstellen wurden mit 1 % Kaninchennormalserum (KNS) blockiert, die Probe dann mit anti-Typ I (vom Meerschwein) und schließlich mit anti- Meerschwein-IgG (Rhodamin) inkubiert. Das für Doppelfärbungen verwendete anti-α-Aktin war direkt mit FITC gekoppelt. Typ IV-Laminin Doppelfärbungen erfolgten mit Kaninchen anti-(Maus)Typ IV und Ziegen anti-(Maus)Laminin.

10. Fototechnik

Für Immunfluoreszenzuntersuchungen wurde das Zeiss 19 Mikroskop oder das inverse Kameramikroskop ICM 405 mit KP 490/500 Filter für FITC- und BP 546/9 Filter für Rhodaminfluoreszenz verwendet. Schwarz-Weiß Fotos wurden auf Kodak Tri-X, Farbdias auf Ektachrom-Professional oder Ektachrom 400 Diafilm aufgenommen. Fluorographien wurden mit einem Kodak Royal X-Omat Röntgenfilm exponiert. Der Entwickler für Schwarz-Weiß Filme war Ultrafin (Tetenal), für Röntgenfilme ein Kodak D 19 Spezialentwickler.

11. Jodierung von Proteinen und Membranen

50 - 100 µg von Kollagenen, Laminin, Fibronektin, 68K-Protein und Zellmembranen wurden gegen 0.05 M Na_2HPO_4, 0.3 M NaCl, pH 7.2 dialysiert. Die Jodierung der Membranen und des Lamininrezeptors (68K-Protein) erfolgte in Gegenwart von 0.1 % NP-40.

11.1 Jodierung mit Chloramin T

100 - 250 µl (25-50 µg) der Proteinlösungen wurden mit 1 mCi ^{125}Jod (in 100 µl Phosphatpuffer) versetzt und nach Zugabe von 30 µl Chloramin T Losung (0.3 mg/ml Phosphatpuffer) 30 s im Eisbad inkubiert (Greenwood, 1963). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl L-Tyrosin (1 mg/ml Phosphatpuffer) gestoppt, das nicht gebundene Jod durch Dialyse entfernt und die Probe bei 4 ^{o}C aufbewahrt.

11.2 Jodierung mit Jodogen

20 µl einer Lösung von Jodogen (Pierce) in Chloroform (1 mg/ml) wurden in ein sauberes Reagensglas pipettiert und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom vertrieben. Nach Zugabe von 25 µg Protein in 100 µl Phosphatpuffer und 1 mCi ^{125}Jod wurde die Mischung 5 min im Eisbad geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Entfernen der Probe aus dem Reaktionsgefäß beendet.

Die spezifische Radioaktivität beider Methoden lag bei Kollagenen, Laminin und Fibronektin bei 0.5-3 x 10^6 cpm/µg,

beim 68K-Protein und Membranen bei 10^5 cpm/µg.

12. Elektronenmikroskopie

12.1 Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden zweimal mit Cacodylatpuffer (0.05 M Cacodylsaure, 1.72 % Sucrose (w/v), pH 7.4) gewaschen und sofort 5 min mit 1 % Glutaraldehyd (Lipton, 1977a) im gleichen Puffer fixiert. Nach 5-maligem Waschen mit Puffer erfolgte 30 min Nachfixierung mit 1 % OsO_4 in Cacodylatpuffer, dann erneut 5 Waschschritte. Die Entwässerung der Probe erfolgte mit ansteigenden Konzentrationen an Athanol, jeweils 15 min. Der 70 %ige Alkohol enthielt zur Kontrastierung 1 % Uranylacetat (UO_2); diese Inkubation wurde 1 h durchgeführt. Anschließend wurde mit Epon (Serva) Athanol (1 : 1) über Nacht bei offener Schale inkubiert. Das Epon wurde dann abgegossen und noch zweimal für 30 min mit reinem Epon nachgewaschen. Anschließend wurde alles Harz bis auf eine 1 mm dicke Schicht abgenommen und die Probe 48 h bei 60 °C polymerisiert.

12.2 Schragbedampfung

Proteine und Membranen wurden in TEA-, TEA-NP- oder TEA-DOC Puffer (100 µg/ml) gelost. Für die Untersuchungen der Bindungsfähigkeit von Laminin an isolierte Membran-

visikel wurden die Membranen in den verschiedenen Puffern mit gegen die gleichen Puffer dialysiertem Laminin (100 µg/ml) 30 min inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit einem gleichen Volumen Glycerol versetzt auf eine Mica-Disc aufgesprüht und in einer Beschichtungsapparatur (Edwards, Modell 306) mit Platin und Kohlenstoff beschichtet.

12.3 Negativfärbung

Für die Negativfärbung wurden die Membranen und Liposomen in einer Konzentration von 50-100 µg/ml in TEA-Puffer direkt mit 1 % Phosphorwolframsäure gefärbt.

Alle Aufnahmen wurden mit einem Siemens Elektronenmikroskop Elmiscope 102 bei 100 kV gemacht.

13. Herstellung der Membranen

20-30 konfluente 10 cm Schalen mit L6-Zellen oder Mausmuskelfibroblasten wurden zweimal mit PBS gewaschen, 30 min mit TEA-Puffer (0.01 M Tris-HCl, 0.001 M PMSF und NEM, pH 7.4) mit 8.5 % Sucrose inkubiert und in einem Dounce Homogenisator homogenisiert. Plasmamembranen von Maus- und Wachtelskelettmuskulatur wurden zunächst 3-5 min mit einem Ultraturrax, dann mit einem Dounce Homogenisator zerkleinert. Die Homogenate von Zellen und Muskulatur wurden 5 min bei 1200 xg zentrifugiert, die Überstände bei 20 000 xg pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in

TEA-Puffer mit 8.5 % Sucrose resuspendiert und auf einen Stufengradienten mit je 10 ml 40 %, 32 % und 17 % Sucrose aufgetragen. Nach Zentrifugieren bei 130 000 xg für 3 h in einem Beckmann SW 27 Rotor wurden die Membranen der 17/32 % Grenzschicht abgenommen und bei 20 000 xg pelletiert (Cates und Holland, 1978).

Der Zweiphasengradient von Brunette und Till (1978) führte nicht zu einer vollständigen Abtrennung der Matrixbestandteile. Membranen, die nach dieser Methode isoliert worden waren, enthielten noch größere Mengen an Laminin, Fibronektin und vor allem Kollagen.

14. Western Blot

14.1 Proteinblot

Für das Elektroblotting Experiment wurden die auf einem 5-18 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennten Membranen auf Nitrozellulosepapier (BioRad) bei 0.3 A, 4 ^{o}C über Nacht tranferriert (Towbin et al., 1979). Die Papierstreifen wurden mit 5 % BSA in Triäthanolaminpuffer (TEA-Puffer) abgesättigt, mit demselben Puffer ohne BSA gewaschen und mit 10^5 cpm ^{125}J-markiertem Laminin (spez. Aktivität 10^6 cpm/μg) 12 h bei RT inkubiert. Nach intensivem Waschen mit TEA-DOC Puffer (0.1 % Deoxycholat) wurden die Streifen getrocknet und mit einem Röntgenfilm exponiert.

14.2 Immunblot

Die Papierstreifen wurden mit Filterpapier getrocknet, 2 h mit 2.5 % BSA in TBS geschüttelt und 2 h mit 1 :10 verdünnter Antikörperlösung (in TBS/2.5 % BSA) inkubiert. Anschließend wurde mit TBS/BSA Puffer 4-5 mal für 30 min gewaschen und für weitere 2 h mit 50 µl Peroxidase (Miles) in 20 ml TBS/BSA inkubiert, dann erneut mit PBS/BSA gewaschen. Die Streifen wurden in 100 ml 0.1 M Cacodylatpuffer mit 1 mg/ml Brenzcatechin und 1 mg/ml 1,4-Phenylendiamin überführt und mit 1 Tropfen 30 % H_2O_2 versetzt (Dziadek, 1983).

15. Sepharosebindungstest

Kollagene, Laminin, Fibronektin und BSA wurden, wie in 5. beschrieben, mit Sepharose 4B gekoppelt. 50 µl Aliquots gepackter Proteinsepharose wurden dann mit 50 000 cpm ^{125}J-markiertem 68K-Protein zwischen 5 und 60 min bei RT in TEA-NP Puffer inkubiert. Die Sepharose-Beads wurden abzentrifugiert, mit TEA-NP Puffer gewaschen, und die gebundene Radioaktivität bestimmt.

16. Liposomenexperimente

16.1 Herstellung der Liposomen

Liposomen wurden aus Lecithin (Sigma) (30 mg/ml TEA-Puffer) durch Ultraschallbehandlung bei 30 Watt (Branson Sonifier, B 12) hergestellt (Racker et al., 1979) und auf einem Sucrosedichtegradienten (8.5 %/17 %- Grenzschicht) isoliert (Lesot et al., 1983).

16.2 Proteineinbau in Liposomen

300 µl Liposomensuspension in TEA-Puffer wurden mit 50 µg 68K-Protein (in 10 µl TEA-NP Puffer) versetzt und über Nacht bei 4 °C gerührt. Die Abtrennung vom nichteingebauten Protein erfolgte wiederum auf dem Sucrosestufengradienten. Die Menge des integrierten 68K-Proteins wurde in einem Parallelversuch mit ^{125}J-markiertem Protein ermittelt.

16.3 Liposomenbindungstests

Je 50 µl Liposomen wurden mit ^{125}J-markiertem Laminin, Fibronektin und Typ I bzw. IV Kollagen 1 h bei RT in TEA-Puffer inkubiert, anschließend auf einen Sucrose Stufengradienten aufgetragen und das gebundene vom ungebundenen Protein abgetrennt. Die Gradienten wurden ausgetropft; es wurden 250 µl-Fraktionen gesammelt und die Radioaktivität im γ-Counter (Beckmann) bestimmt.

LITERATUR

(1) Abbott, J., Schiltz, J., Dienstman, S., and Holtzer, H. (1974) The phenotypic complexity of myogenic clones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1506-1510

(2) Ahkong, Q.F., Fisher, D., Tampion, W., and Lucy, J.A. (1975) Mechanism of cell fusion. Nature (Lond.) 253, 194-195

(3) Ali, I.U. and Hynes, R.O. (1977) Effects of cytochalisin B and colchicine on attachment of a major surface protein of fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta 471, 16-24

(4) Alitalo, K. (1980) Production of both interstitial and basement membrane procollagens by fibroblastic Wi 38 cells from human embryonic lung. Biochem. Biophys. Res. Commun. 93, 873-880

(5) Atherton, B.T. and Hynes, R.O. (1981) A difference between plasma and cellular fibronectins located with monoclonal antibodies. Cell 25, 133-141

(6) Aumailley, M., Nowack, H., and Timpl, R. (1983) Laminin: Structure and cell-binding activity. In: Structural Carbohydrates of the Liver (Popper, H., Reutter, W., Gudat, H., and Köttgen, E., eds) MTP Press, Lancaster, England

(7) Bailey, A.J., Shellswell, G.B., and Duance, V.C. (1979) Identification and change of collagen types in differentiating myoblasts and developing chick muscle. Nature (Lond.) 278, 67-68

(8) Bard, J.B.L. and Hay, E.D. (1975) The behavior of fibroblasts from the developing avian cornea: Their morphology and movement in situ and in vitro. J. Cell Biol. 67, 400-418

(9) Beil, W., Furthmayr, A., and Timpl, R. (1972) Chicken antibodies to soluble rat collagen-1. Characterization of the immune response by precipitation and agglutination methods. Immunochemistry 9, 779-788

(10) Benya, P.D., Padilla, S.R., and Nimni, M.E. (1977) The progenity of rabbit articular chondrocytes synthesize collagen types I and III and type I trimer, but not type II.

Biochemistry 16, 865-872

(11) Bischoff, R. and Holtzer, H.
(1970) Inhibition of myoblast fusion after one round of DNA synthesis in 5-bromodesoxyuridine.
J. Cell Biol. 44, 134-150

(12) Bischoff, R. and Holtzer, H.
(1968) The effect of mitotic inhibitors on myogenesis.
J. Cell Biol. 36, 111-128

(13) Bischoff, R. and Lowe, M.
(1974) Cell surface components and the interactions of myogenic cells.
In: Exploratory Concepts in Muscular Dystrophy II., A.T. Milhorat, edt. Excerpta Medica, Amsterdam, 17-29

(14) Bonner, W.M. and Laskey, R.A.
(1974) A film detection method for tritium labeled proteins and nuclic acids in polyacrylamide gels.
Eur. J. Biochem. 46, 83-88

(15) Bornstein, P.
(1977) Cell surface associated proteins in connective tissue cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 2480-2484

(16) Bornstein, P. and Sage, H.
(1980) Structural distinct collagen types.
Ann. Rev. Biochem. 49, 957-1003

(17) Bornstein, P. and Traub, W.
(1979) The chemistry and biology of collagen.
In: "The Proteins" (H. Neurat and R.L. Hill, eds.), Vol. IV, pp. 411-631. Academic Press, New York.

(18) Brunette, D.M. and Till, J.E.
(1971) A rapid method for the isolation of L-cell surface membranes using an aqueous two-phase polymer system.
J. Membrane Biol. 5, 215-224

(19) Bunge, R.P. and Bunge, M.B.
(1978) Evidence that contact with connective tissue matrix is required for normal interaction between Schwann cells and nerve fibres.
J. Cell Biol. 78, 943-950

(20) Burgeson, R.E., Aladli, F.A., Kaitilla, I.I., and Hollister, D.W.
(1976) Fetal membrane collagens: Identification of two new collagen α chains.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2579-2583

(21) Caplan, A.I.
(1976) A simplified procedure for preparing myogenic

cells for culture.
J. Embryol. Exp. Morph. 36, 175-181

(22) Carlin, B., Jaffe, R., Bender, B., and Chung, A.E.
(1981) Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein.
J. Biol. Chem. 256, 5209-5214

(23) Carlsson, R., Engvall, E., Yoshida, Y., Freeman, A., and Rouslahti, E.
(1981) Laminin and fibronectin in cell adhesion: enhanced adhesion of cells from regenerating liver laminin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2403-2406

(24) Cates, G.A. and Holland, P.C.
(1980) Surface-labelling studies on skeletal-muscle cells in vitro. Heterogeneity of iodinated cell-surface proteins.
Biochem. J. 186, 211-216

(25) Cates, G.A. and Holland, P.C.
(1978) Biosynthesis of plasma membrane proteins during myogenesis of skeletal muscle in vitro.
Biochem. J. 174, 873-881.

(26) Chen, L.B.
(1977) Alteration in cell surface LETS protein during myogenesis.
Cell 10, 393-400

(27) Chen, L.B., Maitland, N., Gallimore, P.H., and McDougall, J.K.
(1977) Detection of the large external transformation-sensitive protein on the cell surface.
Exp. Cell Res. 106, 39-46

(28) Chen, L.B., Murray, A., Segal, R.A., Bushell, A., and Walsh, M.L.
(1978) Studies on intercellular LETS glycoprotein matrices.
Cell 14, 377-391

(29) Chiang, T.M. and Kang, A.H.
(1982) Isolation and purification of collagen α1(I) receptor from human platelet membrane.
J. Biol. Chem. 257, 7581-7586.

(30) Chiang, T.M., Beachey, E.H., and Kang, A.H.
(1977) Binding of collagen α1 chains to human platelets.
J. Clin. Invest. 59, 405-411

(31) Chiang, T.M., Postlethwaite, A.E., Beachey, E.H., Seyer, J.M., and Kang, A.H.
(1978) Binding of chemotactic collagen-derived peptides

to fibroblasts.
J. Clin. Invest. 62, 916-922

(32) Chiquet, M., Puri, E.C., and Turner, D.C.
(1978) Attachment of chicken myoblasts to a gelatinised substratum is mediated by cell attachment protein from horse serum and by chicken fibroblast cell surface protein.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 312, 420-422

(33) Chiquet, M., Pury, E.C., and Turner, D.C.
(1979) Fibronectin mediates attachment of chicken myoblasts to a gelatin coated substratum.
J. Biol. Chem. 254, 5475-5482

(34) Christ, B. and Jacob, H.J.
(1978) Über die embryonale Entwicklung der Gliedmaßenmuskulatur.
Medizin in unserer Zeit 2. Jhg., Nr. 6, 166-176

(35) Chung, A.E., Jaffe, R., Freeman, I.L., Vergnes, J.P., Braginski, J.E., and Carlin, B.
(1979) Properties of a basement membrane-related glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma-derived cell line.
Cell 16, 277-287.

(36) Conrad, G.W., Dessau, W., and v.d.Mark, K.
(1980) Synthesis of type III collagen by embryonic fibroblasts from the embryonic cornea.
J. Cell Biol. 84, 501-512

(37) Coon, H.G.
(1966) Clonal stability and phenotypic expression of chick cartilage cells in vitro.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55, 66-73

(38) Cooper, A.R. and MacQueen, H.A.
(1983) Subunits of laminin are differentially synthesized in mouse eggs and early embryos.
Develop. Biol. 96, 467-471

(39) Cooper, A.R., Kurkinen, M., and Hogan, B.L.M.
(1981) Studies on the biosynthesis of laminin.
Eur. J. Biochem. 119, 189-197

(40) Couchman, J.R., Höök, M., Rees, D.A., and Timpl, R.
(1983) Adhesion, growth, and matrix production by fibroblasts on laminin substrates.
J. Cell Biol. 96, 177-183

(41) Croop, J. and Holtzer, H.
(1975) Response of myogenic and fibrogenic cells to cytochalasin B and to colcemide. I. Light microscope observations.
J. Cell Biol. 65, 271

(42) Crouch, E., Sage, H., and Bornstein, P.
(1980) Structural basis for apparent heterogeneity of collagens in human basement membranes: type IV procollagen contains two distinct chains.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 745-749

(43) Cuatrecasa, P., Wilchek, M. and Anfinsen, C.B.
(1968) Selective enzyme purification by affinity chromatography.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 636-643

(44) Culp, L.A.
(1976) Electrophoretic analysis of substrate-attached proteins from normal and virus-transformed cells.
Biochemistry 15, 4094-4104

(45) Culp, L.A.
(1978) Biochemical determinants of cell adhesion.
Curr. Top. Membr. Transp. 11, 327-396

(46) Culp, L.A.
(1978) Biochemical determinants of cell adhesion.
In: Current Topics in Membranes and Transport: Cell Surface Glycoproteins. Juliano, R. and Rothstein, A., eds., Academic Press, Inc., New York

(47) De'Clerck, Y.A. and Jones, P.A.
(1980) The effect of ascorbic acid on the nature and production of collagen by rat smooth-muscle cells.
Biochem. J. 186, 217-225

(48) Den, H., Malinzak, A.T., Keating, H.J., and Rosenberg, A.
(1975) Influence of concanavalin-A, wheat germ agglutinin, and soybean agglutinin on the fusion of myoblasts in vitro.
J. Cell Biol. 67, 826-834

(49) Dessau, W., Adelmann, B.C., Timpl, R. and Martin, G.R.
(1978a) Identification of the sites in collagen α-chains that bind serum anti-gelatine factor (cold insoluble globuline).
Biochem. J. 169, 55-59.

(50) Dessau, W., Sasse, J., Timpl, R., Jilek, F., and v.d.Mark, K.
(1978b) Synthesis and extracellular deposition of fibronectin in chondrocyte cultures.
J. Cell Biol. 79, 342-355

(51) Dienstmann, S.R., Biehl, H., Holtzer, S., and Holtzer, H.
(1974) Myogenic and chondrogenic lineages in developing limb buds grown in vitro.
Develop. Biol. 39, 83-95

(52) Dodson, J.W. and Hay, E.D.
(1974) Secretion of collagen by corneal epithelium.
J. Exp. Zool. 189, 52-72

(53) Duance, V.C., Restall, D.J., Beard, H., Bourne, F.J., and Baily, A.
(1977) The location of three collagen types in skeletal muscle.
FEBS Letters 79, 248-252

(54) Dziadek, M., Richter, H., Schachner, M., and Timpl, R.
(1983) Monoclonal antibodies used as probes for the structural organization of the central region of fibronectin.
FEBS Letters, 155, 321-325

(55) Ehrismann, R., Chiquet, M., and Turner, D.C.
(1981) Mode of action of fibronectin in promoting chicken myoblast attachment.
J. Biol. Chem. 256, 4056-4062

(56) Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, J.A., Furthmayr, H. Rohde, H. and Timpl, R.
(1981) Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix.
J. Mol. Biol. 150, 97-120.

(57) Epstein, E.H., Scott, R.O., Miller, E.J. and Piez, K.A.
(1971) Isolation and characterization of the peptides derived from soluble human and baboon skin collagen after cyanogen bromide cleavage.
J. Biol. Chem. 246, 1718-1724.

(58) Farquhar, M.G., Courtoy, Lemkin, M.C., and Kanwar, Y.S.
(1981) Current knowledge of the functional architecture of the glomerular basement membrane.
In: New Trends in Basement Membrane Research. K. Kuehn, R. Timpl, and H. Schoene (eds.), Raven Press, New York.

(59) Fear, J.
(1977) Observations on the fusion of chick embryo myoblasts in culture.
J. Anat. 124, 437-444

(60) Fessler, J.H. and Fessler, L.I.
(1978) Biosynthesis of procollagen.
Ann. Rev. Biochem. 47, 129-162

(61) Fessler, L.I. and Fessler, J.
(1982) Identification of the carboxy peptides of mouse procollagen IV and its implications for the assembly and structure of basement membrane procollagen.
J. Biol. Chem. 257, 9804-9810

(62) Fessler, L.I., Kumamoto, C.A., Meis, M.E., and Fessler,

J.H.
(1981a) Assembly and processing of procollagen V (AB) in chick blood vessels and other tissues.
J. Biol. Chem. 256, 9640-9645

(63) Fessler, L.I., Robinson, W.J., and Fessler, J.H.
(1981b) Biosynthesis of procollagen $(pro\alpha1V)_2(pro\alpha2)$ by chick tendon fibroblasts and procollagen $(pro\alpha1V)_3$ by hamster lung cell cultures.
J. Biol. Chem. 256, 9646-9651

(64) Foidart, J.M., Bere, E.W., Yaar, M., Rennard, S.I., Gullino, M., Martin, G.R. and Katz, S.I.
(1980) Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a noncollagenous basement membrane glycoprotein.
Lab. Invest. 42, 336-342.

(65) Foidart, J.M., Berman, J.J., Paglia, L., Rennard, S.I., Abe, S., Perantoni, A.
(1980) Synthesis of fibronectin, laminin, and several collagens by a liver-derived epithelial line.
Lab. Invest. 42, 525-532

(66) Franzini-Armstrong, C.
(1979) A descripton of satellite and invasive cells in frog sartorius.
In: Mauro, A. (ed.)Muscle regeneration. Raven Press, New York, p 233

(67) Friedlander, M. and Fishman, D.A.
(1975) Serological analysis of developing muscle cell surfaces.
J. Cell Biol. 67(2, Pt. 2), 124a (Abstr.)

(68) Furcht, L.T., Mosher, D.F., and Wendelschafer-Crabb, G.
(1978) Immunocytochemical localization of fibronectin (LETS protein) on the surface of L6 myoblasts: Light and electron microscopic studies.
Cell 13, 263-271

(69) Furcht, L.T., Mosher, D., and Wendelschafer-Crabb, G.
(1977) Immunoelectron microscopic localization of fibronectin during myogenesis.
J. Cell Biol. 75, 156a

(70) Gardner, J.M. and Fambrough
(1983) Fibronectin expression during myogenesis.
J. Cell Biol. 96, 474-485

(71) Garrells, J.I.
(1979) Changes in protein synthesis during myogenesis in a clonal cell line.
Develop. Biol. 73, 134-152

(72) Gartner, T.K. and Podleski, T.R.

(1976) Evidence that the types and specific activity of lectins control fusion of L6-myoblasts
Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 1142-1149

(73) Gartner, T.K. and Podleski, T.R.
(1975) Evidence that a membrane bound lectin mediates fusion of L6 myoblasts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 972

(74) Gey, G.O., Svotelis, M., Foard, M., and Bang, F.B.
(1974) Long-term growth of chicken fibroblasts on a collagen substrate.
Exp. Cell Res. 84, 63-71

(75) Goldberg, B.
(1977) Kinetics of processing of type I and III procollagen in fibroblast culturs.
Pro. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3322-3325

(76) Goldberg, B.
(1979) Binding of soluble type I collagen molecules to the fibroblast plasma membrane.
Cell 16, 265-275

(77) Goldberg, B.D.
(1982) Binding of soluble type I collagen to fibroblasts: effects of thermal acti- vation of ligand, ligand concentration, pinocytosis, and cytoskeletal modifiers.
J. Cell Res. 95, 747-751

(78) Gosslau, B. and Barrach, H.-J.
(1979) Enzyme-linked immunosorbent microassay for quantification of specific antibodies to collagen type I, II, III.
J. Immunol. Meth. 29, 71-77

(79) Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Glover, I.S.
(1963) The preparation of ^{131}J-labelled human growth hormon of high specific radioactivity.
Biochem. J. 89, 114-123.

(80) Grinell, F.
(1978) Cellular adhesiveness and extracellular substrata.
Int. Rev. Cytol. 53, 65-144

(81) Grinell, F.
(1980) Fibroblast receptor for cell-substratum adhesion.
J. Cell Biol. 86, 104-112

(82) Grinell, F. and Hays, D.E.
(1978) Cell adhesion and spreading factor: Similarity to cold insoluble globulin in human serum.
Exp. Cell Res. 115, 221-229

(83) Grinell, F., Head, J.R., and Hoffpauir, J.
(1982) Fibronectin and cell shape in vivo: Studies on the endometrium during pregnancy.
J. Cell Biol. 94, 597-606

(84) Hanak, H. and Böck, P.
(1971) Die Feinstruktur der Muskel-Sehneverbindung von Skelett- und Herzmuskel.
J. Ultrastruc. Res. 36, 68-85

(85) Harper, P.A. and Juliano, R.L.
(1981) Fibronectin independent adhesion of fibroblasts to the extracellular matrix: Mediatio by a high m w membrane glycoprotein.
J. Cell Biol. 91, 647-653

(86) Hassell, J.R., Gehron Robey, P., Barrach, H.J., Wilczek, J., Rennard, S.I., Martin, G.R.
(1980) A basement membrane proteoglycan isolated from the EHS sarcoma.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4494-4498

(87) Hauschka, S.D. and Konigsberg, I.R.
(1966) The influence of collagen on the development of muscle clones.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 55, 119-126

(88) Hauschka, S.D. and White, N.K.
(1970)
Excerpta Medica International Congress Series No. 240

(89) Hay, E.D.
(1963) The fine structure of differentiating muscle in the salamander tail.
Z. Zellforsch. 59, 6-34

(90) Hay, E.D.
(1977) Interaction between the cell surface and extracellular matrix in corneal development.
In: "Cell and Tissue Interactions: (J.W. Lash and M.M. Burger, eds.) pp. 115-137. Raven Press, New York.

(91) Hay, E.D.
(1978) Role of basement membranes in development and differentiation.
In: Biology and Chemistry of Basement Membranes. (N.Kefalides, ed.) Academic Press, pp. 119-236

(92) Hay, E.D.
(1981a) Collagen and embryonic development.
In: Biology of the Extracellular Matrix (E.D.Hay, ed.) Plenum Press, pp. 379 -409.

(93) Hay, E.D.
(1981b) Extracellular Matrix.
J. Cell Biol. 91, 205s-223s

(94) Hay, E.D. and Meier, S.
(1974) Glycosaminoglycan synthesis by embryonic inductors: Neural tube, notochord, and lense.
J. Cell Biol. 62, 889-898

(95) Hayman, E.G. and Ruoslathi, E.
(1979) Distribution of fetal bovine serum fibronectin and endogenous rat cell fibronectin in extracellular matrix.
J. Cell Biol. 83, 255-259

(96) Hayman, E.G., Engvall, E., A'Hearn, E., Barnes, D., Pierschbacher, M., and Ruoslahti, E.
(1982) Cell attachment on replicas of SDS polyacrylamide gels reveals two adhesive plasma proteins.
J. Cell Biol. 95, 20-23

(97) Hayman, E.G., Oldberg, A., Martin, G.R., and Ruoslahti, E.
(1982) Codistribution of heparan sulfate proteoglycan, laminin, and fibronectin in the extracellular matrix of normal rat kidney cells and their coordinate absence in transformed cells.
J. Cell Biol. 94, 28-35

(98) Heathcote, J.G., Sear, C.H.J., and Grant, M.E.
(1978) Studies on the assembly of the rat lense capsule, biosynthesis and partial characterization of the collagenous components.
Biochem. J. 176, 283-294

(99) Hedman, K., Johansson, S., Vartio, T., Kjellen, L., Vaheri, A., and Höök, M.
(1982) Structure of the extracellular matrix in human fibroblast cultures: Association of heparan and chondroitin sulfates with the fibronectin-procollagen fibers.
Cell 26, 663-671

(100)Hedman, K., Kurkinen, M., Alitalo, K., Vaheri, A., Johansson, S., and Höök, M.
(1979) Isolation of the pericellular matrix of human fibroblast cultures.
J. Cell Biol. 81, 83-91

(101)Hedman, K., Vaheri, A., and Wartiovaara, J.
(1978) External fibronectin of cultured human fibroblasts is predominantly a matrix protein.
J. Cell Biol. 76, 748-760

(102)Herman, B.A. and Fernandes, S.M.
(1978) Changes in membrane dynamics associated with myogenic cell fusion.
J. Cell Physiol. 94, 253-264

(103)Herrmann,H., Dessau, W., Fessler, L., and v.d.Mark, K.

(1980) Synthesis of types I, III, and AB_2 collagen by chick tendon fibroblasts in vitro.
Eur. J. Biochem. 105, 63-74

(104)Hewitt, A.T., Kleinmann, H.K., Pennypacker, J.P., and Martin, G.R.
(1980) Identification of an adhesive factor for chondrocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 385-388

(105)Hewitt, A.T., Varner, H.H., and Martin, G.R.
(1982a) Isolation and properties of chondronectin, the chondrocyte attachment factor.
In: Immunochemistry of Collagen, Vol. I: Methods, H.Furthmayer, edt., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 135-141

(106)Hewitt, A.T., Varner, H.H., Silver, M.H., Dessau, W., Wilkes, C.M., Martin, G.R.
(1982b) The isolation and partial characterization of chondronectin, an attachment factor for chondrocytes.
J. Biol. Chem. 257, 2330-2334

(107)Hogan, B.L.M.
(1980) High molecular weight extracellular proteins synthesized by endoderm cells derivated from mouse teratocarcinoma cells and normal extraembryonic membranes.
Develop. Biol. 76, 275-285

(108)Hogan, B.L.M., Cooper, A.R., and Kurkinen, M.
(1980) Incorporation into Reichert's membrane of laminin-like extracellular proteins synthesized by parietal endoderm cells of the mouse embryo.
Eur. J. Biochem. 105, 63-74

(109)Holtzer, H.
(1959) Some further uses of antibodies for analyzing the structure and development of muscle.
Exp. Cell Res. 7, 234

(110)Holtzer, H.
(1972) Cell surface changes for cell recognition and fusion.
In: "Cell Differentiation"

(111)Holtzer, H., Rubinstein, N., Chi, J., Dienstman, S., and Biehl, J.
(1973) The phenotypic heterogeneity of myogenic clones and what cells synthesize which molecules.
In: Excerpta Medica Int. Congress Series No. 333, Exploratory concepts in muscular dystrophy, Amsterdam.

(112)Holtzer, H., Weintraub, H., Mayne, R., and Mochan, B.
(1972) The cell cycle, cell lineages and cell differentiation.

Curr. Top. Dev. Biol. 7, 229

(113)Hughes, R.C., Butters, T.D., and Aplin, J.D.
(1981) Cell surface molecules involved in fibronectin-mediated adhesion. A study using specific antisera.
Eur. J. Cell Biol. 26, 198-207

(114)Hughes, R.C., Mills, G., Courtois, Y., and Tassin, J.
(1979) Role of fibronectin in the adhesiveness of bovine lens epithelial cells.
Biol. Cell 36, 321-330

(115)Hynes, R.O.
(1976) Cell surface proteins and malignant transformation.
Biochim. Biophys. Acta 458, 73-107

(116)Hynes, R.O. and Yamada, K.M.
(1982) Fibronectins: Multifunctional modular glycoproteins.
J. Cell Biol. 95, 369-377

(117)Hynes, R.O., Ali, I.U., Destree, A.T., Mautner, V., Perkins, M.E., Senger, D.R.,
(1978) A large glycoprotein lost from the surfaces of transformed cells.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 312, 317-342

(118)Hynes, R.O., Martin, G.S., Critchley, D.R., Shearer, M., and Epstein, C.J.
(1976) Viral transformation of rat myoblasts: Effects on fusion and surface properties.
Develop. Biol. 48, 35-46

(119)Jilek, F. and Hörmann, H.
(1978) Cold-insoluble globulin (fibronectin), IV affinity to soluble collagen of various types.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 247-250

(120)Jilek, F. and Hörmann, H.
(1979) Fibronectin (cold insoluble globulin). VI. Influence of heparin and hyaluronic acid on the binding of native collagen.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 597-603

(121)Johansson, S. and Höök, M.
(1980) Heparin enhences the rate of binding of fibronectin to collagen.
Biochem. J. 187, 521-524

(122)Johansson, S. and Höök, M.
(1983) Substrate adhesion of rat hepatocytes: On the mechanism of cell attachment to fibronectin.
Manuskript

(123)Johansson, S., Hedman, K., Kjellen, L., Christner, J.,

Vaheri, A., and Höök, M.
(1983) Characterization of proteoglycans in the extra-cellular matrix produced by human fibroblasts in vitro.
Manuskript

(124)Johansson, S., Kjellen, J., Höök, M., and Timpl, R.
(1981) Substrate adhesion of rat hepatocytes: A comparison of laminin and fibronectin as attachment proteins.
J. Cell Biol. 90, 260-264

(125)Jonson, S.M., Bangham, A.D., Hill, M.W., and Korn, E.D.
(1971) Single bilayer liposomes.
Biochim. Biophys. Acta 233, 820-826

(126)Kalderon, N.
(1979) Muscle cell fusion.
In: Membrane-Membrane Interactions, N.B. Gilula, edt., Raven Press, New York.

(127)Kalderon, N. and Gilula, N.B.
(1979) Membrane events in myoblast fusion.
J. Cell Biol. 81, 411-425

(128)Kalderon, N., Epstein, M.L., and Gilula, N.B.
(1977) Cell-to-cell communication and myogenesis.
J. Cell Biol. 75, 788-806

(129)Kalderon, N., and Gilula, N.B.
(1977) Analysis of the events involved in myoblast fusion.
J. Cell Biol. 75 (2, Pt. 2), 222a, (Abstract)

(130)Kefalides, N.A., Alper, R. and Clark, C.C.
(1979) Biochemistry and metabolism of basement membranes.
Int. Rev. Cytol. 61, 167-228.

(131)Kenney, M.C. and Carlson, E.
(1978) Ultrastructural identification of collagen and glycosaminoglycans in notochordal extracellular matrix in vivo and in vitro.
Anat. Rec. 190, 827-850

(132)Kessler, S.W.
(1975) Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A-antibody adsorbent.
J. Immunol. 115, 1617-1624

(133)Kessler, S.W.
(1976) Cell membrane antigen isolation with the staphylococcal protein A-antibody adsorbent.
J. Immunol. 117, 1482-1490

(134)Ketley, J.N., Orkin, R.W., and Martin, G.R.

(1976) Collagen in developing chick muscle in vivo and in vitro.
Exp. Cell Res. 99, 261-268

(135)Klebe, R.J.
(1974) Isolation of a collagen-dependent cell attachment.
Nature (London) 250, 248-251

(136)Klebe, R.J. and Mock, P.J.
(1982) Effect of glycosaminoglycans on fibronectin-mediated cell attachment.
J. Cell Physiol. 112, 5-9

(137)Kleinman, H.K., Wilkes, C.M., and Martin, G.R.
(1981) Interaction of fibronectin with collagen fibrils.
Biochemistry 20, 2325-2330

(138)Kleinman, H.K., Hewitt, A.T., Murray, J.C., Liotta, L.A., Rennard, S.I.,
(1979a) Cellular and metabolic specificity in the interaction of adhesion proteins with collagen and with cells.
J. Supramol. Struc. 11, 69-78

(139)Kleinman, H.K., Klebe, R.J., and Martin, G.R.
(1981) Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells.
J. Cell Biol. 88, 473-485

(140)Kleinman, H.K., Martin, G.R., and Fishman, P.H.
(1979b) Ganglioside inhibition of fibronectin-mediated cell adhesion to collagen.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3367-3371

(141)Knudsen, K.A. and Horwitz, A.F.
(1977b) Tandem events in myoblast fusion.
J. Supramol. Struct. S 1, 39

(142)Knudsen, K.A. and Horwitz, A.F.
(1977a) Tandem events in myoblast fusion.
Develop. Biol. 58, 328-338

(143)Koehler, J.K., Nudelmann, E.D. and Hakomori, S.
(1980) A collagen binding protein on the surface of ejaculated rabbit spermatozoa.
J. Cell Biol. 86, 529-536.

(144)Konigsberg, I.R.
(1963) Clonal analysis of myogenesis.
Science 140, 1273-1284

(145)Konigsberg, I.R.
(1971) Diffusion-mediated control of myoblast fusion.
Develop. Biol. 26, 132-152

(146)Konigsberg, I.R. and Hauschka, S.D.
(1965) Cell and tissue interactions in the reproduction of cell type.
In:Reproduction: Molecular, Subcellular, and Cellular (ed. M. Locke) pp. 243-290 N.Y., Academic Press

(147)Konigsberg, I.R., Sollmann, P.A., and Mixter, L.O.
(1978) The duration of the terminal G_1 of fusing myoblasts.
Develop. Biol. 63, 11-26

(148)Kosher, R.A. and Church, R.L.
(1975) Stimulation of in vitro chondrogenesis by procollagen and collagen.
Nature (London) 258, 327-330

(149)Krstic, R.V.
(1978) Skeletmuskulatur. Aufbau eines Primärbündels ("Fleischfaser").
In: Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere. p. 258, Springer- Verlag

(150)Kumamoto, C.A. and Fessler, J.H.
(1980) Biosynthesis of A,B procollagen.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6434-6438

(151)Kumamoto, C.A. and Fessler, J.H.
(1981) Propeptides of procollagen V (A,B) in chick embryo crop.
J. Biol. Chem. 256, 7053-7058

(152)Kuusela, P., Ruoslathi, E., Engvall, E., and Vaheri, A.
(1976) Immunological interspecies crossreactions of fibroblast surface antigen (Fibronectin).
Immunochemistry 1, 639-642

(153)Kühl, U., Timpl, R., and v.d.Mark, K.
(1982) Synthyesis of type IV collagen and laminin in cultures of skeletal muscle cells and their assembly on the surface of myotubes.
Develop. Biol. 93, 344-354

(154)Kühn, K.
(1982) Chemical properties of collagen.
In: Immunochemistry of the Extracellular Matrix 1, 1-29, H. Furthmayr (Ed), CRC Press, Inc., Florida

(155)Kühn, K., Wiedemann, H., Timpl, R., Resteli, J., Dieringer, H., Voss, T., Glanville, R.
(1981) Macromolecular structure of basement membrane collagens.
FEBS Letters 125, 123-128

(156)Laemmli, U.K.
(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature (London) 227, 680-685.

(157)Landon, D.N.
(1970) Observations on the morphogenesis of rat skeletal muscle.
J. Anat. 107, 385

(158)Landon, D.N.
(1971) A quantitative study of some of the fine structural features of developing myotubes in the rat.
J. Anat. 110, 170

(159)Laskey, R.A. and Mills, A.D.
(1975) Quantitative film detection of ^{3}H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography.
Eur. J. Biochem. 56, 335-341

(160)Laurie, G.W., Leblond, C.P., and Martin, G.R.
(1982) Localization of type IV collagen, Laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes.
J. Cell Biol. 95, 340-344

(161)Lawson, D., Raff, M.C., Gomperts, B., Fewtrell, C., and Gilula, N.B.
(1977) Molecular event during membrane fusion. A study of exocytosis in rat peritoneal mast cells.
J. Cell Biol. 72, 242-259

(162)Lesot, H., Kühl, U., and v.d.Mark, K.
(1983) Isolation of a laminin-binding protein (68K-protein) from muscle cell membranes.
EMBO Journal 2, 861-865

(163)Letho, V.P., Vartio, T., and Virtanen, I.
(1980) Enrichment of a 140 KD surface glycoprotein in adherent, detergent- resistant cytoskeletons of cultured human fibroblasts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 909-916

(164)Letourneau, P.C., Ray, P.N., and Bernfield, M.R.
(1980) The regulation of cell behavior by cell adhesion.
In: Biological Regulation and Development 2, 339-376, ed. R.F. Goldberger, Plenum Press, New York

(165)Leung, J.P., Trotter, J.A., Munar, E., and Nameroff, M.
(1975) Differentiation of the myogenic cell surface.
In: ICN-UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, Vol. 2 (D. McMahon and D.F. Fox, eds.). W.A. Benjamin Co., Menlo Park, Ca.

(166)Lindahl, U. and Höök, M.
(1978) Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules.
Ann. Rev. Biochem. 47, 385-417

(167)Linder, E., Vaheri, A., Ruoslathi, E., and Wartiovaara, J.
(1975) Distribution of fibroblast surface antigen in the developing chick embryo.
J. Exp. Med. 142, 41-49

(168)Linsenmayer, T.F., Gibney, E., Toole, B.P., and Gross, J.
(1978) Cellular adhesion to collagen.
Exp. Cell Res. 116, 470-474

(169)Liotta, L.A., Rao, C.N., and Barsky, S.H.
(1983) Laminin receptors on human breast carcinoma: Role in invasion of the extracellular matrix.
In: "Clinical and Laboratory Concepts". (M.A. Rich, ed.)

(170)Liotta, L.A., Vembu, D., Kleinman, H.K., Martin, G.R., and Bonne, C.
(1978) Collagen required for proliferation of cultured connective tissue cells but not their transformed counter parts.
Nature (London) 272, 622-624

(171)Lipton, B.H.
(1977a) A fine-structural analysis of normal and modulated cells in myogenic cultures.
Develop. Biol. 60, 26-47

(172)Lipton, B.H.
(1977b) Collagen synthesis by normal and bromodeoxy-uridine-modulated cells in myogenic culture.
Develop. Biol. 61, 153-165

(173)Lipton, H.B. and Konigsberg, I.R.
(1972) A fine structural analysis of the fusion of myogenic cells.
J. Cell Biol. 53, 348-364

(174)Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.
(1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275

(175)Mark, H.v.d. and v.d.Mark, K.
(1979) Isolation and characterization of collagen A and B chains from chick embryos.
FEBS Lett. 99, 101-105

(176)Mark, H.v.d., v.d.Mark, K., and Gay, S.
(1976b) Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluerescence. Part II.
Develop. Biol. 53, 153-170

(177)Mark, H.v.d., v.d.Mark, K., and Gay, S.
(1976a) Study of differential collagen synthesis during development of the chick embryo by immunofluorescence. Part I.
Develop. Biol. 48, 237-249

(178)Mark, K.v.d.
(1981) Localization of collagen types in tissues.
Int. Rev. Connect. Tissue Res. 9, 265

(179)Mark, K.v.d., Dessau, W., v.d.Mark, H., Kühl, U., and Herrmann, H.
(1981) Collagen types as markers for differentiation of connective tissue cells.
In: International Cell Biology 1980-1981, edt. H.G. Schweiger, Springer-Verlag, pp.542-551

(180)Mark, K.v.d., Gauss, V., v.d.Mark, H., and Müller, P.K.
(1977) Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chodrocytes lose their cartilage phenotype in culture.
Nature (London) 267, 531-532

(181)Mark, K.v.d., Mollenhauer, J., Kühl, U., Bee, J., and Lesot, H.
(1983) Anchorins, a new class of membrane proteins involved in cell-matrix interactions.
In: 42th Annual Meeting of the American Soc. Develop. Biol. R.L. Trelstad ed., Alan Riss Inc., New York

(182)Mark, K.v.d., Sasse, J., v.d.Mark, H., and Kühl, U.
(1982) Changes in the distribution of collagen types during embryonic developement.
Connect. Tissue Res. 10, 37-41

(183)Mark, K.v.d., v.d.Mark, H., and Gay, S.
(1976) Study of differential collagen synthesis of chick embryo by immunofluorescence.
Develop. Biol. 48, 237-249

(184)Martin, F. and MacDonald, R.
(1974) Liposomes can mimic virus membranes.
Nature (London) 252, 161-163

(185)Martin, G.R. and Rubin, H.
(1974) Effects of cell adhesion to the substratum on the growth of chick embryo fibroblasts.
Exp. Cell Res. 85, 319-333

(186)Maslow, D.E.
(1976) In vitro analysis of surface specificity in embryonic cells.
In: "The Cell surface in animal embryogenesis and developement." G. Poste and G.L. Nicolson, edts., Elsviere/North-Holland Biomedical Press pp. 697-745.

(187)Mastaglia, F.L., Dawkins, R.L., and Papadimitriou, J.M.
(1975) Morphological changes in skeletal muscle after transplantation.
J. Neurol. Sci. 25, 227

(188)Mauro, A.
(1961) Satellite cell of skeletal muscle fibres.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 493

(189)Mayne, R. and Strahs, K.R.
(1974) Collagen synthesis by cultures of chick myotubes depleted of mononucleated cells.
J. Cell Biol. 63, 212a

(190)Mayne, R., Wiedemann, H., Dessau, W., Mark., K.v.d., and Bruckner, P.
(1982) Structural and immunological characterization of type IV collagen isolated from chicken tissues.
Eur. J. Biochem. 126, 417-423

(191)Mayne, R.M., Vail, S., Mayne, P.M., and Miller, E.J.
(1976) Changes in collagen types as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1674-1678

(192)Meier, S. and Hay, E.D.
(1974a) Control of corneal differentiation by extracellular materials. Collagen as a promoter and stabilizer of epithelial stroma production.
Develop. Biol. 38, 249-270

(193)Meier, S. and Hay, E.D.
(1974b) Stimulation of extracellular matrix synthesis in the developing cornea by glycosaminoglycans.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2310-2313

(194)Meier, S. and Hay, E.D.
(1973) Synthesis of sulfated glycosaminoglycanes by embryonic corneal epithelium.
Develop. Biol. 35, 318-335

(195)Miller, E.J.
(1976) Biochemical characteristics and biological significance of the genetically distinct collagens.
Mol. Cell Biol. 13, 165-192

(196)Minor, R.R., Clarke, C.C., Strase, E.L., Koszalka, T.R., Brent, R.L., and Kefalides, N.A.
(1976) Basement membrane procollagen is not converted to collagen in organ cultures of prietal yolk sac endoderm.
J. Biol. Chem. 251, 1789-1794

(197)Mir-Lechaire, F.J. and Barondes, S.H.
(1978) Two distinct developmentally regulated lectins

in chick embryo muscle.
Nature (London) 272, 256-258

(198)Mollenhauer, J. and v.d.Mark, K.
(1983) Isolation and characterization of a collagen-binding glycoprotein from chondrocyte membranes.
EMBO Journal 2, 45-50

(199)Mosesson, M.
(1977) Cold-insoluble globulin (CIg), a circulating cell surface protein.
Thrombos. Haemostas. 38, 742-750

(200)Mosesson, M.W. and Amrani, D.L.
(1980) The structure and biologic activities of plasma fibronectin.
Blood 56, 145

(201)Moss, F.P. and Leblond, C.P.
(1971) Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats.
Anat. Rec. 170, 421

(202)Muir, A.R., Kanji, A.H.M., and Allbrook, D.B.
(1965) The structure of satellite cells in skeletal muscle.
J. Anat. 99, 435

(203)Murray, J.C., Liotta, L.A., Rennard, S.I., and Martin, G.R.
(1980) Collagen adhesion characterization of metastatic and nonmetastatic tumor cells.
Cancer Res. 40, 347-351

(204)Murray, J.C., Stingl, G., Kleinman, H.K., Martin, G.R., and Katz, S.I.
(1979) Epidermal cells adhere preferentially to type IV (basement membrane) collagen.
J. Cell Biol. 80, 197-202

(205)Müller, P.K., Lemmen, C., Gay, S., Gauss, V., and Kühn, K.
(1977) Immunochemical and biochemical study of collagen synthesis of the genetically distinct collagens.
Exp. Cell Res. 108, 47-55

(206)Nameroff, M. and Munar, E.
(1976) Inhibition of cellular differentiation by phospholipase C.
Develop. Biol. 49, 288

(207)Nathanson, M.A., Hilfer, S.R., and Searls, R.L.
(1978) Formation of cartilage by non-chondrogenic cell types.
Develop. Biol. 64, 99-117

(208)Neff, N.T., Lowrey, C., Decker, C., Tovar, A., Damsky, C., Buck, C., and Horwitz, A.F.
(1982) A monoclonal antibody detaches embryonic skeletal muscle from extracellular matrices.
J. Cell Biol. 95, 654-666

(209)Nielsen, L.D., Pitts, M., Grady, S.R. and McGuire, E.J.
(1981) Cell-cell adhesion in the embryonic chick: Partial purification of liver adhesion molecules from liver membranes.
Develop. Biol. 86, 315-326.

(210)Nowack, H., Gay, S., Wick, G., Becker, U., and Timpl, R.
(1976) Preparation and use in immunohistology of antibodies specific for type I and type III procollagen.
J. Immunol. Methods 12, 117-124

(211)O'Neill, M.C. and Stockdale, F.E.
(1974) 5-bromodeoxyuridine inhibition of differentiation. Kinetics of inhibition and reversal in myoblasts.
Develop. Biol. 37, 117-132

(212)Oakley, B.R., Kirsch, D.R., and Morris, N.R.
(1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. 105, 361-363.

(213)Oberbäumer, I., Wiedemann, H., and Kühn, K.
(1982) Shape and assembly of type IV procollagen obtained from cell culture.
EMBO Journal 1, 805-810

(214)Ocklind, C. and Öbrink, B.
(1982) Intercellular adhesion of rat hepatocytes. Identofication of a cell surface glycoprotein involved in the initial adhesion process.
J. Biol. Chem. 257, 6788

(215)Öbrink, B. and Ocklind, C.
(1978) Cell surface components involved in rat hepatocyte intercellular adhesion.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 837

(216)Oldberg, A., Kjellen, L., and Höök, M.
(1979) Cell-surface heparan sulfate.
J. Biol. Chem. 254, 8505-8510

(217)Ott, U., Odermatt, E., Engel, J., Furthmayer, H., and Timpl, R.
(1981) Protease resistance and conformation of laminin.
Eur. J. Biochem. 123, 63-72

(218)Pacifici, M. and Molinaro, M.
(1980) Developmental changes in glycosaminoglycanes

during skeletal muscle cell differentiation in cultures.
Exp. Cell Res. 126, 143-152

(219)Pauw, P.G. and David, J.D.
(1979) Alterations in surface proteins during myogenesis of a rat myoblast cell line.
Develop. Biol. 70, 27-38

(220)Pearlstein, E.
(1976) Substrate activation of cell adhesion factor as a prerequisite for cell attachment.
Int. J. Cancer 22, 32-35

(221)Pearlstein, E.
(1976) Plasma membrane glycoprotein which mediates adhesion of fibroblasts to collagen.
Nature (London) 262, 497-499

(222)Pearlstein, E., Gold, L., and Garcia-Pardo, A.
(1980) Fibronectin: A review of its structure and biological activity.
Mol. Cell Biochem. 29, 103-127

(223)Pearson, C.M.
(1963) Pathology of human muscular dystrophy.
In: "Muscular dystrophy in man and animals" (G.H. Bourne and M.N. Golarz, eds.), Chap. 1. Hafner, , New York.

(224)Pearson, M.L.
(1980) Muscle differentiation in cell culture: A problem in somatic cell and molecular genetics.
In: The Molecular Genetics of Development: An Introduction to recent research on experimental systems (T. Leighton and W.F. Loomis, jr., eds) Acad. Press, N.Y.

(225)Perkins, R.C., Beth, A.H., Wilkerson, L.S., Serafin, W., Dalton, L.R., Park, C.R., and Park, J.H.
(1980) Enhencement of free radical reduction by eluated concentrations of ascorbic acid in avian dystrophic muscle.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 790-794

(226)Podleski, T.R., Greenberg, I., Schlessinger, J., and Yamada, K.M.
(1979) Fibronectin delays the fusion of L_6 myoblasts.
Exp. Cell Res. 122, 317-326

(227)Prives, J. and Paterson, B.M.
(1974) Differentiation of cell membranes in cultures of embryonic chick breast muscle.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3208

(228)Prockop, D.J., Berg, R.A., Kivirikko, K.I., and Uitto,

J.
(1976) Intracellular steps in the biosynthesis of collagen.
In: "Biochemistry of collagen" (G.M. Ramachandran and A.H. Reddi, eds.), pp. 163-274. Plenum Press, New York.

(229)Puri, E.C. and Turner, D.C.
(1978) Serum-free medium allows chicken myogenic cells to be cultivated in suspension and separated from attached fibroblasts.
Exp. Cell Res. 115, 159-173

(230)Quaroni, A., Isselbacher, K.J., and Ruoslathi, E.
(1978) Fibronectin synthesis by epithelial crypt cells of rat small intestine.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5548

(231)Racker, E., Violand, B., O'Neal, S., Alfonzo, M., and Telford, J.
(1979) Reconstitution, a way of biochemical research; some new approaches to membrane-bound enzymes.
Arch. Biochem. Biophys. 198, 470-477

(232)Ramaekers, F.C.S., Haag, D., Kant, A., Moesker, O., Jap, P.H.K., and Vooijs, G.P.
(1983) Coexpression of keratin- and vimentin-type intermediate filaments in human metastatic carcinoma cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2618-2622

(233)Rao, C.N., Margulies, I.M.K., Tralka, T.S., Terranova, U.P., Madri, J.A. and Liotta, L.A.
(1982) Isolation of a submit of laminin and its role in molecular sructure and tumor cell attachment.
J. Biol. Chem. 257, 9740-9744.

(234)Rhode, H., Wick, G., and Timpl, R.
(1979) Immunochemical characterization of the basement membrane glycoprotein laminin.
Eur. J. Biochem. 102, 195-201

(235)Rhodes, R.K. and Miller, E.J.
(1980) Physiochemical characterization and molecular organization of the collagen A and B chains.
Biochemistry 17, 3442-3448

(236)Richler, C. and Yaffe, D.
(1970) The in vitro cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines.
Develop. Biol. 23, 1-22

(237)Risteli, J., Rohde, H., and Timpl, R.
(1979) Sensitive radioimmunoassay for 7S and laminin: Application to serum and tissue studies of basement membranes.
J. Biochem. 102, 195-201

(238)Roll, F.J. and Madri, J.A.
(1982) Immunocytochemical techniques in connective tissue research.
Immunochemistry of the Extracellular Matrix 2, Furthmayer, H., Ed., CRC Press, Boca Raton, Fla., chap. 2

(239)Rubin, K., Höök, M., Öbrink, B., and Timpl, R.
(1981) Substrate adhesion of rat hepatocytes: Mechanism of attachment to collagen substrates.
Cell 24, 463-470

(240)Rubin, K., Johansson, S., Pettersson, I., Ocklind, C., Öbrink, B., and Höök, M.
(1979) Attachment of rat hepatocytes to collagen and fibronectin; a study using antibodies directed against cell surface components.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 91, 86-94

(241)Ruoslathi, E., Engvall, E., and Hayman, G.
(1981) Fibronectin: current concepts of its structure and functions.
Coll. Res. 1, 95-128

(242)Ruoslathi, E., Pekkala, A., and Engvall, E.
(1979) Effect of dextran sulfate on fibronectin-collagen interaction.
FEBS Letters 107, 51-54

(243)Sage, H. and Bornstein, P.
(1979) Characterization of a novel collagen chain in human placenta and its relation to AB collagen.
Biochemistry 18, 3815-3822

(244)Sanes, J.R. and Cheney, J.M.
(1982) Laminin, fibronectin, and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membrane.
J. Cell Biol. 93, 442-451.

(245)Sanes, J.R. and Hall, Z.W.
(1979) Antibodies that bind specifically to synaptic sites on muscle fiber basal lamina.
J. Cell Biol. 83, 357-370

(246)Sanes, J.R. and Lawrence, J.C., Jr.
(1983) Activity-dependent accumulation of basal lamina by cultured rat myotubes.
Develop. Biol. 97 (submitted)

(247)Sanger, J.W.
(1974) The use of cytochalasin B to distinguish myoblasts from fibroblasts in cultures of developing chick striated muscle.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3621-3625

(248)Sasse, J.
(1981)
Dissertation

(249)Sasse, J., v.d.Mark, H., Kükl, U., Dessau, W., and v.d.Mark, K.
(1981) Origin of collagen types I, III and V in cultures of avian skeletal muscle.
Develop. Biol 83, 79-89

(250)Schuppan, D., Timpl, R., and Glanville, R.W.
(1980) Discontinuities in the triple helical sequence Gly-X-Y of basement membrane (type IV) collagen.
FEBS Letters 115, 297-300

(251)Sessions, A. and Horwitz, A.F.
(1983) Differentiation-related differences in the plasma-membrane phospholipid asymetry of myogenic and fibrogenic cells
Biochim. Biophys. Acta 728, 103-111

(252)Slater, C.R.
(1976) Control of myogenesis in vitro by chick embryo extract.
Develop. Biol. 50, 264

(253)Stenman, S. and Vaheri, A.
(1978) Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissue.
J. Exp. Med. 147, 1054-1064

(254)Stephens, H., Bendayan, M. and Silver, M.
(1982) Immunochemical localization of collagen types and laminin in skeletal muscle with the protein A-gold technique.
Bio. Cell 44, 81-84.

(255)Sugrue, S.P. and Hay, E.D.
(1982) Interaction of embryonic corneal epithelium with exogenous collagen, lamin, and fibronectin: role of endogenous protein synthesis.
Develop. Biol. 92, 97-106

(256)Tanzer, M.L. and Kefalides, N.A.
(1973) Collagen crosslinks: occurrence in basement membrane collagen.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 775-780

(257)Tarone, G., Galetto, G., Prat, M., and Comoglio, P.M.
(1982) Cell surface molecules and fibronectin-mediated cell adhesion: effect of proteolytic digestion of membrane proteins.
J. Cell Biol. 94, 179-186

(258)Teichberg, V.I., Silman, I., Beitsch, D.D., and Resheff, G.

(1974) A α-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of Electrophorus electricus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1383-1387

(259)Terranova, V.P., Liotta, L.A., Russo, R.G. and Martin, G.R.
(1982) Role of laminin in the attachment and metastasis of murine tumor cells.
Cancer Res. 42, 2265-2269.

(260)Terranova, V.P., Rao, C.N., Kalebic, T., Margulies, I.M., and Liotta, L.A.
(1983) Laminin receptor on human breast carcinoma cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 444-448

(261)Terranova, V.P., Rohrbach, D.H., and Martin, G.R.
(1980) Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen.
Cell 22, 719-726

(262)Timpl, R. and Martin, G.R.
(1982) Components of basement membranes.
In: Immunochemistry of the Extracellular Matrix. Vol. II, pp. 119-150. H. Furthmayer, ed., CRC Press.

(263)Timpl, R., Bruckner, P. and Fietzek, P.
(1978a) Characterization of pepsin fragments of basement membrane collagen obtained from a mouse tumor.
Eur. J. Biochem. 95, 255-263.

(264)Timpl, R., Johansson, S., van Delden, V., Oberbäumer, I., and Höök, M.
(1983) Characterization of protease-resistant fragments of laminin mediating attachment and spreading of rat hepatocytes.
J. Biol. Chem. (submitted)

(265)Timpl, R., Martin, G.R., Bruckner, P., Wick, G., and Wiedemann, H.
(1978) Nature of the collagenous proteins in a tumor basement membrane.
Eur. J. Biochem. 84, 43-52

(266)Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M. and Martin, G.R.
(1979) Laminin - A glycoprotein from basement membrane.
J. Biol. Chem. 254, 9933-9937.

(267)Timpl, R., Wiedemann, H., van Delden, V., Furthmayer, H., and Kühn, K.
(1981) A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes.
Eur. J. Biochem. 120, 203-211

(268)Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.

(1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354

(269)Tryggvason, K., Pihlajaniemi, T., Salo, T., Liotta, L.A., and Kivirikko, K.I.
(1982) Studies on the biosynthesis and degradation of type IV procollagen.
In: New Trends in Basement Membrane Research. K. Kuehn, H. Schoene, and R. Timpl (eds.), Raven Press, New York.

(270)Tryggvason, K., Robey, P., and Martin, G.R.
(1980) Biosynthesis of type IV procollagens.
Biochemistry 19, 1284-1289

(271)Turner, D.C.
(1978) Differentiation in cultures derived from embryonic chicken muscle.
Differentiation 10, 81-93

(272)Vaheri, A., Kurkinen, M., Lehto, V.-P., Linder, E., and Timpl, R.
(1978) Codistribution of pericellular matrix proteins in cultured fibroblasts and loss in transformation. Fibronectin and procollagen.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4944-4948

(273)Vlodavsky, I., Lui, G.M., and Gospodarowicz, D.
(1980) Morphological appearance, growth behavior and migratory activity of human tumor cells maintained on extracellular matrix versus plastic.
Cell 19, 607-616

(274)Voller, A., Bidwell, D.E., and Bartlett, A.
(1976)
In: Manual of Clinical Immunology (N. Rose and H. Fishman, eds.), pp. 506-512. Amer. Soc. for Mocrobiology, Washington, D.C.

(275)Vracko, R. and Bendit, E.P.
(1972) Basal lamina: The scaffold for orderly cell replacement.
J. Cell Biol. 55, 406-419

(276)Wahrmann, J.P., Delain, D., and Macieira-Coelho, A.
(1981) Modulation of differentiation in vitro. I. Influence of the attachment surface on myogenesis.
In Vitro 17, 752-762

(277)Warburton, M.J., Ferns, S.A., and Rudland, P.S.
(1982) Enhanced synthesis of basement membane proteins during the differentiatio of rat mammary tumor epithelial cells into myoepithelial-like cells in vitro.
Exp. Cell Res. 137, 373-380

(278)Wartiovaara, J. and Leivo, I.
(1982) Basement membrane matrices and early mouse development.
In: New Trends in Basement Membrane Research. K. Kuehn, H.Schoene, and R. Timpl (eds.), Raven Press, New York.

(279)Wartiovaara, J., Leivo, I., and Vaheri, A.
(1980) Matrix glycoproteins in early mouse development and in differentiation of teratocarcinome cells.
In: The Cell Surface: Mediator of Developmental Processes.S.Subtelny and N.K. Wessells, eds. Academic Press, Inc., New York.305-324

(280)White, N.K. and Hauschka, S.D.
(1971) Muscle development in vitro. A new conditioned medium effect on colony differentiation.
Exp. Cell Res. 67, 479-482

(281)White, N.K., Bonner, P.H., Nelson, D.R., and Hauschka, S.D.
(1975) Clonal analysis of vertebrate myogenesis. IV. Medium dependent classification of colony-forming cells.
Develop. Biol. 44, 346-361

(282)Wick, G., Glanville, R.W., and Timpl, R.
(1979) Characterization of antibodies to basement membrane (type IV) collagen in immunohistological studies.
Immunobiol. 156, 372

(283)Yaffe, D.
(1968) Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 477-483

(284)Yaffe, D.
(1969) Cellular aspects of muscle differentiation in vitro.
Curr. Top. Develop. Biol. 4, 37

(285)Yaffe, D.
(1971) Developmental changes preceding cell fusion during muscle differentiation in vitro.
Exp. Cell Res. 66, 33-48

(286)Yaffe, D. and Dym, H.
(1972) Gene expression during differentiation of contractile muscle fibres.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 543-571

(287)Yaffe, D. and Feldman, M.
(1965) The formation of hybride multinucleated muscle fibers from myoblasts of different genetic origin.
Dev. Biol. 11, 300-317

(288)Yamada, K.M.
(1981) Fibronectin and other structural proteins.
In: Cell Biology of Extracellular Matrix. E. Hay (ed.), Plenum Press, New York and London.

(289)Yamada, K.M.
(1983) Cell surface interactions with extracellular materials.
Ann. Rev. Biochem. 52, 761-799

(290)Yamada, K.M. and Kennedy, D.W.
(1979) Fibroblast cellular and plasma fibronectins are similar but not identical.
J. Cell. Biol. 80, 492-498

(291)Yamada, K.M. and Olden, K.
(1982) Action of tunicamycin on vertebrate cells.
In: "Tunicamycin", G. Tamura, edt. Jap. Scient. Soc. Press, Tokyo, pp. 119-144.

(292)Yamada, K.M. and Olden, K.
(1978) Fibronectins - adhesive glycoproteins of cell surface and blood.
Nature (London) 275, 179-184

(293)Yamada, K.M., Olden, K., and Hahn, L.E.
(1980) Cell surface protein and cell interactions.
In: The Cell Surface: Mediator of Developmental Processes. Subtelny, S. and Wessells, N.K., Eds., Academic Press, New York, 1980, 43

LEBENSLAUF

Uwe Kühl

geboren am 23.9.1952 in Hamburg

Eltern: Karl-Friedrich Kühl, Staatl. Angestellter

Käte Kühl, geb. Wessel, Kaufm. Angestellte

SCHULBILDUNG

1959-1961 Grundschule in Hamburg

1961-1963 Grundschule in Krailling

1963-1972 Kurt-Huber-Gymnasium in Gräfelfing

Abschluß mit dem Abitur im Juni 1972

Studium

ab WS 1972/73 Studium der Chemie (Wahlfach Biochemie) an der Ludwig-Maximilians-Universität München

ab WS 1977/78 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Hauptdiplom (Chemie) im November 1977

Juni 1978 - Juni 1979 Diplomarbeit im organischen Institut der Universittät München (Leiter: Prof. Rolf Huisgen)

ab Juli 1979 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Bindegewebsforschung (Leiter: Prof. Klaus Kühn)